



STATISTISCHE EN EXPERIMENTEELE BIJDAGEN TOT HET WEIL-VRAAGSTUK IN NEDERLAND

Stanford Medical Library

UIT HET LABORATORIUM VAN DE AFDEELING
TROPISCHE HYGIËNE VAN DE KONINKLIJKE
VEREENIGING „KOLONIAAL INSTITUUT”
TE AMSTERDAM.

H. ESSEVELD.

STATISTISCHE EN EXPERIMENTEELE BIJDRAGEN
TOT HET WEIL-VRAAGSTUK IN NEDERLAND.
UIT HET LABORATORIUM VAN DE AFDEELING
TROPISCHE HYGIËNE VAN DE KONINKLIJKE
VEREENIGING „KOLONIAAL INSTITUUT”
TE AMSTERDAM.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

STATISTISCHE EN EXPERIMENTEELE BIJDRAGEN TOT HET WEIL-VRAAGSTUK IN NEDERLAND.

UIT HET LABORATORIUM VAN DE AFDEELING
TROPISCHE HYGIËNE VAN DE KONINKLIJKE
VEREENIGING „KOLONIAAL INSTITUUT”
TE AMSTERDAM.

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE
UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM, OP
GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS
Dr. E. LAQUEUR, HOOGLEERAAR IN DE
FACULTEIT DER GENEESKUNDE, IN HET
OPENBAAR TE VERDEDIGEN IN DE AULA
DER UNIVERSITEIT OP WOENSDAG 19 MEI
1937, 'S NAMIDDAGS TE 3.30 UUR PRECIES

DOOR

HENDRIKUS ESSEVELD

OFFICIER VAN GEZONDHEID TWEEDE KLASSE
VAN HET KONINKL. NEDERL.-INDISCHE LEGER
GEBOREN TE 'S-GRAVENHAGE.

AAN MIJN MOEDER.
AAN MIJN VROUW.

Het verschijnen van dit proefschrift biedt mij de welkome gelegenheid om U, hoogleeraren, lectoren en privaats-docenten van de medische faculteit te Leiden, mijn erkentelijkheid voor het van U ontvangen onderwijs te betuigen.

Hooggeleerde TENDELOO, bij U als assistent werkzaam geweest te zijn en hierbij Uw kernachtigen geest medegemaakt te hebben, is door mij steeds als een groot voorrecht beschouwd, waarvoor ik U ten zeerste dankbaar ben.

Hooggeleerde SCHÜFFNER, Hooggeëerde Promotor, U ben ik bijzonderen dank verschuldigd voor de scholing, die ik onder Uw leiding mocht doormaken en voor de ruime en welwillende hulp, die U mij bij de samenstelling van dit boekje gaf. Het is mij onmogelijk in enkele woorden weer te geven, hoeveel de omgang met Uw rijke persoonlijkheid voor mij beteekende.

Hooggeleerde SNIJDERS, U ben ik zeer erkentelijk voor alles wat ik in deze jaren van U kon leeren. Aan Uw vriendelijke raadgevingen zal ik steeds een dankbare herinnering bewaren.

Hooggeleerde SWELLENGREBEL, behalve voor wat ik van U geleerd heb, ben ik U ook ten zeerste verplicht voor Uw daadwerkelijken steun bij de vertaling der samenvatting.

Hooggeleerde BRUG, het was mij een groot voorrecht Uw interessanten cursus te mogen volgen.

Zeergeleerde WALCH-SORGDRAGER, Uw vriendelijke hulp en raad, waarop ik nooit tevergeefs een beroep deed, droegen er in niet geringe mate toe bij, den tijd, welken ik op het Instituut doorbracht, tot een voor mij zeer aangename periode te maken.

U, mede-assistenten, adjunct-assistenten en allen, die op het kantoor en het laboratorium van het Tropisch Instituut werkzaam zijn, dank ik voor den prettigen omgang en samenwerking.

Zeergeachte Mej. L. BOHLANDER, voor de toewijding en betrouwbaarheid waarmede U het vele werk verrichtte, dat de onderzoekingen voor U medebrachten, ben ik U zeer dankbaar.

Mij rest nog aan allen, die tot de bewerking van dit proefschrift op eenigerlei wijze bijdroegen, mijn welgemeenden dank uit te spreken. In het bijzonder geldt dit U zeergeachte Mej. G. v. D. MEER, Mej. H. KETTNER en de Heeren HOEKSTRA, HARKINK en JÜNGEN.

I N H O U D.

Hfdst.	Bldz.
I. Inleiding	1
II. De bacteriologische en serologische diagnostiek bij de ziekte van Weil	8
1. <i>Centrifugatie van patiënten-bloed.</i>	
2. <i>Dierproef om de parasieten aan te toonen.</i>	
3. <i>De serologische reacties.</i>	
III. Sero-reacties van patiënten, waarbij leptospirae werden aangetoond; onderscheiden in gevallen met en zonder icterus	24
IV. Titers bij de overige Weil-patiënten	28
V. Sero-reacties na toediening van anti-Weil-serum . . .	31
1. <i>Heeft inspuiting van anti-serum invloed op het titer- verloop bij Weil-patiënten?</i>	
2. <i>Reacties bij patiënten, niet lijdende aan de ziekte van Weil.</i>	
3. <i>Inspuiting van anti-serum bij konijnen.</i>	
VI. Sero-reacties met formol-cultures	46
VII. De soortbepaling der leptospira-stammen uit mensen, ratten en honden in Nederland, met behulp van hoogwaar- dige immuun-sera	50
VIII. Serologische vergelijking der klassieke Weil-stammen op grond van de reacties met patiënten-sera	58
IX. Immunitet bij de ziekte van Weil	70
1. <i>Inleiding.</i>	
2. <i>Immuun-sera, gewonnen uit konijn en paard.</i>	
3. <i>Proefnemingen over de bereiding van dood vaccin door verwarming van leptospira-kweeken.</i>	
4. <i>Virulente leptospirae na 10 minuten verwarming op 50° C. bij caviae ingespoten.</i>	
5. <i>Vaccinatie van konijnen en menschen met dood vaccin.</i>	
X. Samenvatting	94
Summary	100
Zusammenfassung	106

HOOFDSTUK I.

Inleiding.

De ziekte van Weil is sinds 1915, toen de verwekker zoowel in Japan als in Deutschland werd ontdekt, een vruchtbaar studie-object geweest.

In Nederland duurde het tot 1924, voordat een Weil-infectie met volle zekerheid werd vastgesteld. Een jaar tevoren hadden K u e n e n en S c h ü f f n e r gevonden, dat een belangrijk gedeelte der riool-ratten met leptospira ictero-haemorrhagiae besmet was. De huisartsen en internisten hebben daarna steeds meer Weil ontmaskerd; aanvankelijk alleen de zware gevallen met icterus, later ook de lichtere zonder icterus.

Vanaf 1929 wordt de ziekte in de „Verslagen en Mededeelingen betreffende de Volksgezondheid” opgenomen; sinds 1932 is de aangifte van de ziekte van Weil verplicht gesteld. Daar tot dit jaar het laboratorium-onderzoek hoofdzakelijk in het Centraal Laboratorium en het Instituut voor Tropische Hygiëne werd verricht, kunnen we ook de vóór 1932 gevonden gevallen mederekenen om het totale vastgestelde aantal infecties te benaderen. In totaal werd 756 maal de diagnose gesteld, op de volgende wijze verdeeld over de jaren:

	1924 '25	1926	1927	1928	1929	1930	1931	1932	1933	1934	1935	1936	Totaal
Aantal	14	12	9	8	13	26	31	207	156	118	93	69	756
Sterfgev.	4	4	2	0	2	4	3	16	11	17	3	7	73

Door zijn hoogen top blinkt het jaar 1932 bijzonder uit. Dit is het jaar, waarin de verplichte aangifte begon, en waardoor dus uit den aard der zaak het aantal moest stijgen. Er is echter in dit jaar ook een werkelijke toename der Weil-infecties waar te nemen, waarop wij later terugkomen.

De verdeeling over de verschillende provincies van het land is in

den volgende staat opgenomen, waarbij de eerste kolom het absolute aantal, per provincie opgegeven, bevat, de tweede het aantal per 100.000 inwoners; de laatste voor een meer zuivere vergelijking.

**Totaal aantal Weil-infecties van 1924 tot en met 1936,
verdeeld over de provincies.**

	Totaal	Per 100000 inwoners
Friesland	10	2.4
Groningen	10	2.4
Drente	6	2.5
Overijssel	25	4.0
Gelderland	33	3.7
Utrecht	59	13.0
Noord-Holland	122	7.6
Zuid-Holland	451	21.6
Zeeland	6	2.4
Noord-Brabant	14	1.4
Limburg	20	3.4
Nederland	756	8.9

Het kaartje geeft de verdeeling aanschouwelijk weer.

Zuid-Holland, Utrecht en Noord-Holland, de provincies, die ten Westen van de waterlinie liggen, leverden de meeste zieken. Dit is zoo opvallend, dat men zich onmiddellijk afvraagt, of dit misschien met den grooten waterrijkdom van deze streken samenhangt. Waar echter Friesland, dat in waterrijkdom voor Zuid-Holland niet onderdoet, zich in een zeer laag cijfer — slechts $\frac{1}{4}$ van dat van Zuid-Holland — verheugt, gaat het niet aan den waterrijkdom alleen aansprakelijk te stellen. Tal van andere factoren, waarop hier niet nader kan worden ingegaan, zullen hierbij medewerken. Aan de ziekte zijn gestorven 73 menschen, een cijfer dat zeker beneden het werkelijke blijft, maar desondanks als het meest betrouwbare van dit officieel verzamelde materiaal aan te zien is.

Gescheiden hiervan zal in dit boekje worden afgegaan alleen op die gevallen, waarvan het onderzoekingsmateriaal aan het Instituut voor Tropische Hygiëne werd aangeboden. Door zooveel mogelijk met de behandelende geneesheeren contact te houden en dank zij de welwillende medewerking, beschikt het Instituut over talrijke, zij het ook niet altijd volledige gegevens, die een meer speciale bewerking mogelijk maakten. Al bedraagt het aantal verzamelde ge-

Weil-infecties
van
1924 t.e.m. 1936.



vallen nog niet eens de helft van het officieel bekend geworden aantal (329 tegen 756), toch is het cijfer hoog genoeg, om te mogen verwachten, dat zich hierin het ware beeld weerspiegelt. Het lijstje op bladzijde 4 geeft een overzicht van alle jaarlijks aangeboden en in ons Instituut herkende Weil-gevallen, gesplitst in mannen, vrouwen en kinderen, en in de gevallen met en zonder icterus, en van de letaliteit.

De volgende feiten komen door deze cijfers aan het licht:

1. dat in het jaar 1932 het aantal aan ons Instituut aangeboden gevallen ineens meer dan 4 maal zoo hoog wordt, hetgeen wel als bewijs mag gelden voor een in dit jaar sterk gestegen infectiekans. Ook de dalende tendenz in de latere jaren spreekt in denzelfden zin;
2. dat de vrouwen bijna 10 keer minder zieken leverden dan de

	1925	'26	'27	'28	'29	'30	'31	'32	'33	'34	'35	'36	totaal	
totaal	16	12	7	8	13	20	18	84	55	45	26	30	334	over- leden
mannen	13	9	7	6	11	19	15	79	49	39	23	25	295	38
vrouwen	2	3	0	2	0	0	3	4	6	5	2	3	30	2
kinderen	1	0	0	0	2	1	0	1	0	1	1	2	9	—
zonder ict.	1	3	0	1	4	6	6	38	22	15	4	11	111	
met icterus	15	9	7	7	9	14	12	46	33	30	22	19	223	18 ⁰ / ₀
overleden zonder ict.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
met icterus	4	4	2	0	2	4	2	5	4	8	1	4	40	
Van 1924 t/m 1931 73 icterus-gevallen met 18 overledenen, is 25 ⁰ / ₀								Van 1932 t/m 1936 150 icterus-gevallen met 22 overledenen, is 15 ⁰ / ₀						

mannen, de kinderen zelfs 30 keer minder. Aangezien wij voor de verklaring van deze merkwaardige verhouding niet genoeg gegevens bezitten, en daarom weinig meer dan gissingen zouden kunnen geven, volstaan wij met het opgeven van de naakte feiten;

3. dat het aantal gevallen zonder icterus in verhouding tot het jaarlijksche totale getal schommelt tusschen 0 en 45 %. Afgaande op epidemieën, waar men $\frac{1}{3}$ der patiënten met, en $\frac{2}{3}$ zonder icterus zien kan, zou men op de 223 gevallen met, 446 zonder icterus mogen verwachten, terwijl het werkelijk gediagnostiseerde aantal maar $\frac{1}{4}$, n.l. 111 bedroeg. Niet minder dan 336 gevallen zouden dus aan de diagnose, die hier inderdaad zeer moeilijk is, ontsnapt zijn. Het meest gunstige cijfer heeft het jaar 1932, waarin weliswaar niet 100 % maar toch 41 % van de icteruslooze patiënten werd herkend. In dit jaar hebben epidemieën de diagnose van deze rudimentaire Weil-gevallen vergemakkelijkt. Het minst gunstige cijfer leverden de eerste 4 jaren met 5 en 38 gevallen, m.a.w. van het te verwachten getal 76 werd slechts 5 is 6.6 % behaald;

In andere landen is de verhouding nog veel slechter; behalve uit Frankrijk (Costa en Troisier), Duitschland (Gaethgens) en Engeland (Fairley) ontbreekt het aan mededeelingen over gediagnostiseerde sporadische gevallen van morbus Weili sine ictero; bij epidemieën worden ze geregeld opgemerkt;

4. dat de letaliteit slechts naar het aantal gevallen met icterus be-

rekend mag worden. Gevallen zonder icterus genezen allen. Aan den anderen kant is hun diagnose gebrekkig en, zooals zoo juist toegelicht is, schommelt ze sterk. Een meer zuivere basis geven de icterus-gevallen, waarbij de diagnose door het opvallende symptoom, de icterus, in de goede richting geleid wordt. De letaliteit onder deze gevallen is 18 %, een percentage, dat de ziekte tot een ernstige stempelt. Stelt men het aantal gevallen vóór 1932 en daarna samen, dan is de letaliteit voor de eerste periode zelfs 25 %, voor de laatste periode slechts 15. De oorzaak van dit aanzienlijke verschil kan liggen aan de *genius epidemicus*, die na 1931 in een mildere gedaante verschijnt. Verder zou in de eerste jaren een zekere selectie hebben plaats gevonden, doordat de zwaardere gevallen meer opvielen. En tenslotte zou de ziekte in de laatste 5 jaren beter en vooral vroegtijdiger met immuun-serum zijn behandeld. Mocht dit laatste werkelijk de oorzaak zijn, en dat is niet onwaarschijnlijk, dan zou hierin een nieuwe aansporing liggen om de behandeling te vervroegen en daardoor nog betere uitkomsten te bereiken!

In het volgende lijstje zijn de gevallen gezamenlijk vanaf 1924 volgens de maanden gerangschikt. Tevens is opgegeven, hoe de infectie werd verkregen.

	Jan.	Febr.	Mrt	April	Mei	Juni	Juli	Aug.	Sept.	Oct.	Nov.	Dec.	Totaal
Zwemmen	—	—	—	1	2	12	35	58	52	2	—	—	162
Ongeval	4	—	3	3	3	2	7	6	8	6	5	5	52
Bezigheid	—	1	1	2	2	3	6	13	12	10	7	3	60
Onbekend	1	—	1	1	—	7	7	15	16	3	3	1	55
Totaal	5	1	5	7	7	24	55	92	88	21	15	9	329 *)
Doodsgevallen	1	—	—	2	1	2	5	11	7	4	3	4	40

De cijfers hebben maar een enkele toelichting noodig. Het overgrote aantal der infecties valt in de zomermaanden Juli, Augustus en September, in het geheel 235 van 329, terwijl op Dec. tot en met Maart slechts 19 gevallen komen. De kans op een besmetting is in den winter wel veel geringer, maar ze blijft in ons land, tijdens het heele jaar bestaan.

*) Het totaal wijkt iets af van dat der voorgaande samenstelling, omdat daarin de *canicola*-koorts werd medegerekend.

De breede top in den zomer is van de zwemsport afhankelijk, die in de drie maanden hoogtij viert. In warme jaren kan ook de maand Juni nog iets bijdragen. Vermoedelijk zal ook een deel der onder „onbekend” opgenomen gevallen, waarvan het aantal eveneens in de 4 maanden oploopt, bij deze groep behooren.

Het zwemmen begint pas in het jaar 1932 een zoo voorname plaats in te nemen. In de voorafgegane jaren was zijn aandeel veel geringer, geringer zelfs dan dat der ongevallen. De cijfers voor de twee tijdperken afzonderlijk samengesteld zijn:

	1924 t/m 1931	1932 t/m 1936
na zwemmen . . .	32	130
na val in het water	35	17
door het beroep enz.	14	46
onbekend	13	42

Na 1932 treedt het zwemmen als de oorzaak van de infectie weer op den achtergrond, en wel loopen de cijfers van 67 in 1932 op zelfs 9 in 1936 terug. Dit houdt stellig verband met het feit, dat epidemieën onder de bezoekers van zweminrichtingen zooals in Rotterdam, Dordrecht, Gouda, enz., geleidelijk verdwenen; met groote waarschijnlijkheid is dit een gevolg van de rattenbestrijding en het verscherpte toezicht op het opruimen van ratten lokkend materiaal (voedingsresten). Naast deze verklaring, die op een vooruitgang van den strijd tegen de ziekte zou wijzen, is er echter nog een tweede, n.l. dat het aantal baden per hoofd in de latere jaren is teruggegaan. Voorzover dit een gevolg zou zijn van een minder gunstige weersgesteldheid, zou men hieraan verder geen aandacht behoeven te schenken. Mocht het mindere baden er echter op berusten, dat met het bekend worden van het „Weil”-gevaar, zich meer en meer menschen laten afschrikken, dan zou dit een verkeerde uitwerking zijn.

Een ander karakter dan de zwemkromme vertoont de tweede reeks cijfers, waarin de ongevallen, val in het water, poging tot zelfmoord, zijn opgenomen. De verheffing in den zomer is hier slechts aangeduid, wel zijn er meer gevallen in de tweede helft van het jaar genoteerd (39 tegen 15 in de eerste helft). Overigens getuigt juist deze lijn van de continuïteit der besmetting, doordat tot op Februari na alle maanden bezet zijn.

De derde reeks, die de infecties in verband met het beroep of

bezigheid vermeldt, is wederom door een zomertop, die zich tot November rekt, gekenmerkt. Onder deze rubriek vallen ook de menschen, die bij het visschen de ziekte opliepen.

Tot zoover de inleidende opmerkingen, die een gedrongen overzicht over de ziekte van Weil in Nederland geven. Al neemt de ziekte tegenover andere, met honderden of duizenden gevallen, maar een ondergeschikte plaats in, toch verdient zij onze volle aandacht, omdat wij de overtuiging hebben, dat daardoor een aantal slachtoffers, dat nu nog jaarlijks valt, gered kan worden.

De nu volgende hoofdstukken zullen behandelen, wat er zich verder uit onze statistiek laat opmaken, en welke uitkomsten wij met onze proefnemingen behaalden.

HOOFDSTUK II.

De bacteriologische en serologische diagnostiek bij de ziekte van Weil.

Van 1924 tot en met 1936 is bij 334 patiënten uit Nederland de ziekte van Weil gediagnosticeerd in het Instituut voor Tropische Hygiëne.

Deze gevallen werden herkend door middel van bacteriologische en serologische onderzoeken. De volgende methoden vonden hierbij toepassing:

1. centrifugatie, teneinde in het patiënten-bloed direct de leptospirae te vinden;
2. bloed-inspuiting intraperitoneaal bij caviae om eventueel aanwezige leptospirae op het spoor te komen en urine-inspuiting bij caviae op dezelfde wijze en om dezelfde reden;
3. lysis-agglutinatie proeven ingezet met leptospira-culturen en patiënten-sera.

Deze verschillende onderzoekingswijzen werden zoo veel mogelijk naast elkaar toegepast. Hieronder zal elk aan een bespreking onderworpen worden.

1. Centrifugatie van patiënten-bloed.

Bij de ziekte van Weil schijnt de anti-serum-therapie levensreddend te kunnen werken, mits het serum in de eerste dagen van de ziekte — uiterlijk bij beginnenden icterus — wordt toegediend.

In de eerste dagen is echter de klinische diagnose nauwelijks met zekerheid te stellen, terwijl de aanwezigheid van den verwekker in het bloed den bacterioloog de kans biedt de leptospirae microscopisch, in het donkere veld, aan te toonen. Meestal is echter het aantal parasieten in het stroomende bloed zoo gering, dat microscopisch onderzoek van het bloed zonder meer bij groote uitzondering een positieven uitslag geeft. Men moet dus trachten de kansen te verhoogen. Dit nu geschiedt door citraat- of oxalaatbloed, in welken vorm wij het bloed meestal ontvangen,

- a. te centrifugeeren gedurende 15 minuten (1500 toeren per minuut), waardoor de bloedlichaampjes neerslaan. In het verkregen heldere plasma zijn de leptospirae gemakkelijker op te sporen, vooral omdat men door een dikkere laag heen kan zien;
- b. door het plasma een tweeden keer te centrifugeeren met een hoog toerental (3000 omwentelingen per minuut) gedurende 30 minuten, teneinde de in de vloeistof zwevende leptospirae uit te slingeren.

Deze duplo-centrifugatie, aangegeven door A. Ch. Ruys, is sinds haar publicatie in alle daarvoor in aanmerking komende gevallen toegepast.

De methode is ook nu nog geenszins volmaakt, echter eenvoudiger dan de oorspronkelijk door Blanchard en Lefrou aangegeven, en door Sieburgh gemodificeerde triple-centrifugatie. Hierbij contrifugeert men in twee tempo's, resp. 5 en 8 minuten om de corpusculaire elementen van het bloed neer te slaan en dan pas volgt, wat boven onder b is opgegeven.

De grootste moeilijkheid is hierbij het uitslingeren der leptospirae. Verandering in pH of verschuiving in de eiwitfracties van het milieu brachten hierin geen verbetering, evenmin de toevoeging van saponine of zouten. De oplossing van dit probleem zou voor de vroegtijdige diagnose een groote vooruitgang beteekenen. In tabel 1 worden de resultaten der besproken methode opgegeven.

Op de tabel staan 37 gevallen, gerekend vanaf den 84sten patiënt (1931); sindsdien werd de centrifugatie naast de cavia-proef regelmatig toegepast. Op één geval na is de cavia-proef altijd positief geweest, een bewijs, dat het ontnomen bloed ook werkelijk leptospirae bevatte. Microscopisch konden de leptospirae slechts in 10 gevallen onder het oog gebracht worden; dit is dus ongeveer in $\frac{1}{4}$ gedeelte. Twee keer was reeds direct in het ongecentrifugeerde serum de diagnose microscopisch mogelijk. Ondanks de kleine kans van slechts 1 : 4 is het te behalen voordeel voor de diagnose de meerdere moeite waard.

Uit grafiek 2, vooruitlopend op de volgende bladzijden, is te lezen, dat de positieve uitslagen bij de centrifugatie relatief meer in de eerste ziektedagen vielen. Toch is er op den 7den dag onder de 6 gevallen nog één positief. Latere centrifugaties gaven slechts negatieve uitslagen.

Het groote aantal negatieve uitkomsten bij het microscopische onderzoek geeft wel sterk den indruk, dat het aantal leptospirae

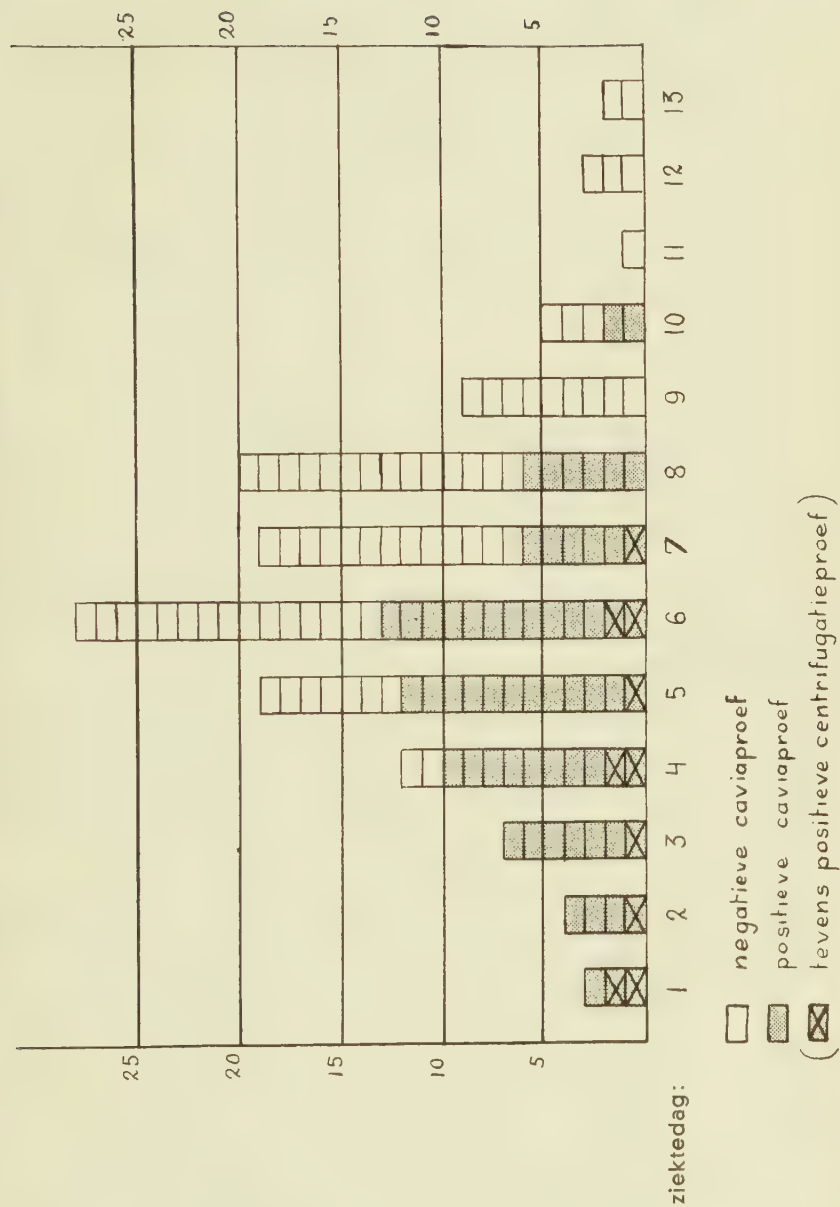
TABEL 1. Resultaten van het microscopische onderzoek naar den verwekker in het bloed.

Patient, nummer	Lept. aangetoond in bloed			Cavia- proef	Ziekte- dag
	direct in serum	triple- centr. methode	duplo- centr. methode		
84		+		+	1
95		—		+	4
106				—	1
108		—		— ¹⁾	4
112				—	5
116				—	5
143				—	4
171				—	3
173				—	4
182			— ²⁾	—	4
186				—	6
188				—	6
195				—	4
203			—	—	3
205			—	+	5
206			— + ²⁾	+	5
210			+	+	3
213			—	+	3
218			—	+	6
220			—	+	4
246			—	+	5
248			—	+	6
250			—	+	5
259			+	+	6
265			—	+	4
270			—	+	4
271			—	+	4
280			—	+	8
285			—	+	6
286			—	+	7
289			—	+	6
290			+	+	7
291			+	+	2
306			—	+	5
316			—	+	5
317			—	+	8
330	+		++ ²⁾	+	6

¹⁾ De cavia-proef is met bloed van een lateren ziekte-dag verricht, zoodat het negatieve teeken geen waarde heeft.

²⁾ Zeer talrijke leptospiren.

GRAFIEK 2. Resultaten der overenting van patiëntenbloed op caviae.



per eenheid bloed meestal uiterst gering moet zijn. Niettegenstaande dat slaat de ziekte bij de caviae aan; dit wijst er op, dat de in het bloed aanwezige leptospirae een sterke virulentie moeten bezitten. Misschien hangt hiermede ook samen de groote bewegelijkheid, die deze leptospirae vertoonen, soms nog uren, nadat het bloed was ont-nomen en bij kamertemperatuur was bewaard.

2. *Dierproef om de parasieten aan te toonen.*

Door caviae intraperitoneaal in te spuiten met bloed of urine (soms lumbaalvocht of sectie-materiaal) heeft men de meeste kans de leptospirae op het spoor te komen. Jonge caviae van 200 à 300 gram zijn het best bruikbaar; zwaardere dieren komen de infectie vaker te boven.

Elk dier wordt intraperitoneaal ingespoten met $\frac{1}{2}$ of 1 cc. van het ter onderzoek ontvangen bloed, hetzij citraat-, of nog beter oxalaatbloed (resp. 0.2 en 0.1 %). Zelfs gebruiken we gestold bloed, waarvan ook de van te voren fijngewreven bloedkoek mede wordt ingespoten.

Gaat het om een zieke, die ervan verdacht wordt leptospirae door de nieren uit te scheiden, dan verdient het aanbeveling de urine zoo versch mogelijk te gebruiken, het liefst de tweede ochtendurine. Wel hebben wij soms geobserveerd, dat leptospirae in de urine tot 24 uur levend bleven, maar regel is dit niet, integendeel, leptospirae plegen in urine vrij vlug te gronde te gaan.

Gewoonlijk worden van elk monster twee caviae ingespoten. Daarna onderzoeken we het peritoneaalvocht en het bloed der proefdieren in het donkere veld op de aanwezigheid van leptospirae, zoo noodig dagelijks. Zoodra het bloed positief blijkt te zijn, wordt steriel hart-punctie verricht en van het gewonnen bloed eenige (4 of 5) druppels geënt op vloeibare voedingsbodems.

Caviae, bij welke de infectie aanslaat, succombeeren meestal op den 6den tot 9den dag. Enkele dagen te voren verschijnt de icterus, zichtbaar aan de gele kleur der conjunctivae, van de ooren, of ook van de haren in de omgeving van het orificium urethrae. Bij de sectie is de icterus nog scherper waar te nemen; in twijfelachtige gevallen geeft het onderzoek van de urine de beslissing. Verder behooren bij het macroscopische sectiebeeld bloedingen gelocaliseerd onder de sereuze vliezen, vooral van de longen, en onder de huid.

Alleen bij vroegen dood kan men in de lever bij microscopisch onderzoek nog rijkelijk leptospirae verwachten. Bij den dood op een later tijdstip geven alleen de nieren nog kans op een positief resultaat.

Na de voorafgaande korte beschrijving dezer vrijwel algemeen gebruikelijke werkwijze, die o.a. reeds door Postmus en Schultz uitvoerig is beschreven, moge nu het overzicht volgen van de resultaten, die deze methode in de praktijk opleverde.

In totaal werden bij 87 patiënten leptospirae aangetoond. In de meeste gevallen gelukte het ook den stam te verkrijgen en te behouden, om dezen later bij voldoende dichtheid der cultuur te identificeeren.

De leptospirae werden opgespoord:

- 63 maal uit het bloed (bij 61 patiënten).
- 20 maal uit de urine.
- 3 maal uit het bloed en de urine.
- 2 maal uit de lever.
- 1 maal uit het lumbaalvocht.

Uit het bloed werd dus 66 maal den verwekker aangetoond; hiervan is ons in 63 gevallen de ziektedag bekend, waarop het bloed was ontnomen. Tegenover deze 66 entingen met positief resultaat, staan 79 negatieve bij Weil-patiënten; hieronder waren er 10, waarvan de ziektedag ons niet medegedeeld werd.

Grafiek 2 geeft een overzicht van deze positieve en negatieve uitslagen, gerangschikt volgens de ons opgegeven ziektedagen.

Hieruit zien we, dat tot en met den 4den ziektedag de kans zeer groot is, den stam uit het bloed te kweken. Immers van de 26 gevallen, blijft enting slechts twee keer negatief, en wel in beide gevallen met bloedmonsters van den 4den dag. Op den 5den dag wordt het aantal negatieve proeven van de 19 reeds 7; op den 6den dag van de 28 — 15. De volgende dagen wordt de kans op een positief resultaat minder. Toch is zelfs op den 10den dag 2 maal een positief resultaat bereikt. Dit mag wel als een aanwijzing gelden, dat het ter verkrijging van de volledige bacteriologische diagnose, toch nuttig is tot en met den 10den dag de caviae-proef te verrichten. Was dit met ons materiaal regelmatig geschied dan zouden wij caviae geënt hebben met bloed van:

den	6den dag	35	maal,	inplaats van	28	maal,
„	7den	„	29	„	„	19
„	8sten	„	34	„	„	20
„	9den	„	25	„	„	9
„	10den	„	32	„	„	5

Waarschijnlijk zou het aantal positieve gevallen evenredig aanzienlijk hooger geweest zijn, dan nu, waar we van den 6den dag de

caviae-proef niet meer regelmatig toepasten. Met dit hier verkregen inzicht dient men in de toekomst rekening te houden.

Voor de isolatie van de verwekkers uit de urine, volstaan we met het onderstaande lijstje der 23 positieve proeven:

1	maal urine van den	7den	ziektedag.
2	„ „ „ „	11den	„
2	„ „ „ „	12den	„
3	„ „ „ „	16den	„
1	„ „ „ „	17den	„
4	„ „ „ „	18den	„
2	„ „ „ „	19den	„
2	„ „ „ „	20sten	„
1	„ „ „ „	21sten	„
1	„ „ „ „	25sten	„
1	„ „ „ „	27sten	„
1	„ „ „ „	37sten	„
2	„ „ „ „	onbekenden	„

(Onder deze uit de urine gekweekte leptospira-stammen bleken er 2 tot het canicola-type te behooren.)

Een negatief resultaat hadden 28 urine-entingen bij caviae: de urine was afkomstig van patiënten van den 11den tot den 52sten (éénmaal 90sten) dag.

Terwijl meestal opgegeven wordt, dat omstreeks den 15den dag de kans om leptospirae uit de urine te kweken het grootst is, was in 5 onzer gevallen de proef reeds op een vroegeren datum positief. Bij systematisch onderzoek, waarvoor ons helaas de gelegenheid ontbreekt, kan men dan ook waarnemen, dat het afvoeren der leptospirae door de urine op een vroeger tijdstip der ziekte begint, dan gewoonlijk opgegeven wordt. Over den duur der uitscheiding geeft ons materiaal in het geheel geen inzicht.

Het geval, waarbij de leptospirae uit de lever werden geïsoleerd, dateert uit 1924 en is indertijd door Goudsmit, Hammer en Wolff gepubliceerd; het eerste geval in ons land!

Ook werden de leptospirae eens microscopisch in de lever aange-toond.

Uit het lumbaalvocht gelukte het éénmaal leptospirae te kweken; het betrof een patiënt met symptomen van meningitis, waarbij men op den 5den dag tot lumbaalpunctie overging. *)

*) Zie Schüffner en Walch-Sorgdrager: Meningitis bij ziekte van Weil (Ned. Tijdschr. v. Gen. 1936, pag. 3000).

Uit den aard der zaak werd ons slechts enkele malen lumbaalvocht toegezonden. Meestal wordt aan de mogelijkheid van een leptospira-infectie niet gedacht en zoo gaat menig punctaat voor dit bijzondere onderzoek, waar een zekere routine voor noodig is, verloren.

3. *De serologische reacties.*

In de overige gevallen kan de diagnose in het laboratorium slechts door middel van sero-reacties worden gesteld. De titers worden korthedshalve aangegeven door de reciproke getalswaarde van de sterkste verdunningen der te onderzoeken sera, waarin nog duidelijk een aantal leptospirae wordt opgelost. *)

De lysis der leptospirae reikt tot hoogere verdunning dan de agglutinatie. De laatste kan bij zwak positieve reacties geheel achterwege blijven. Bij sera met hoogen titer treedt de agglutinatie slechts in de eerste verdunningen (b.v. tot 1 : 100, 1 : 1000, zelden hooger) op, waarna de lysis pas begint en oploopen kan tot hooge waarden.

De uitvoering dezer serologische reacties, die met den microscoop in het donkere veld worden afgelezen, is uitvoerig beschreven in diverse geschriften uit ons Instituut.

Voor 1932 werd als verdunningsreeks 1/10, 1/25, 1/50, 1/100, 1/250 enz. genomen; daarna is de reeks 1/10, 1/30, 1/100, 1/300 enz. gekozen. Hiermede werd aan de nauwkeurigheid geen afbreuk gedaan, terwijl de vereenvoudiging van de op zichzelf zoo bewerkelijke reactie een aanzienlijke besparing in tijd gaf en toch de vergelijking met de meer uitvoerige waarden van vroeger mogelijk bleef.

Voor de diagnostiek der leptospiroses kan de serologische reactie inderdaad als een hechte basis beschouwd worden. Dit konden we afleiden uit de gevallen, waarbij tevens de verwekkers aangetoond werden (zie later). Onspecifieke reacties komen zelden voor en beperken zich dan tot de lage serum-verdunningen.

Een belangrijke stijging van den titer in het verloop eener infectieziekte is ook bij de ziekte van Weil „de hoeksteen van de serologische diagnose”. (S n i j d e r s.)

Als van een patiënt, waarbij de ziekte van Weil klinisch typisch verloopt, slechts éénmaal bloed ter onderzoek komt, en hierbij een

*) Het teeken > gebruiken we, als in de hoogere verdunning nog een zeer geringe lysis optreedt; b.v. > 100 wil zeggen, dat in de verdunning 1 : 300 ook nog een spootje lysis aantoonbaar is.

titer van 300 gevonden wordt, dan vatten we dit in het algemeen als een bevestiging van de diagnose op.

We maken echter de restrictie, dat een sero-reactie van 1:300 nog jaren na het doorstaan der ziekte bij menschen kan worden aangetoond; zulke blijvende reacties zouden dus bij een andere acute ziekte met koorts tot vergissingen kunnen voeren. Overigens zijn het juist deze gevallen met een lagen titer, waarbij een meervoudige herhaling der serumproef gewenscht is, om een eventueel stijgen of dalen waar te nemen.

Bij sterker positieve reacties, tot 1:30.000 en meer kan men met toenemende zekerheid de aanwezige of pas doorstane ziekte als die van Weil beschouwen, zoodat men tenslotte met één reactie kan volstaan.

Behalve de leptospira icterohaemorrhagiae komt in Nederland nog een andere pathogene leptospira voor, n.l. de leptospira canicola, die onder honden als de veroorzaker eener aparte leptospirosis verspreid is. Sinds de ontdekking van deze soort (gemeenschappelijk met Prof. Klarenbeek in 1931 gevonden), wordt in het Instituut van alle ingekomen patiënten-sera ook met de canicola een reactie ingezet. Hierdoor gelukte het in 11 gevallen (tot Mei 1937) een canicola-infectie bij den mensch aan te toonen. Tweemaal werd de stam uit de urine gekweekt.

De ziekte door deze soort opgewekt, doet zich bij den mensch, volgens de tot nu toe geobserveerde gevallen, als onschuldiger voor, dan de klassieke ziekte van Weil. Zij verloopt zonder icterus, evenals in den regel bij de honden en caviae. Bij ratten is deze soort tot nu toe niet gevonden. De verspreiding door water kan daarom buiten beschouwing worden gelaten. Verder heeft deze leptospira haar eigen antigene structuur, zoodat ze door de sero-reactie gemakkelijk kan worden herkend. Er bestaat echter een zekere verwantschap tusschen den klassieken stam en de canicola, die zich uit in hogere of lagere mede-agglutinatie. Slechts in enkele gevallen bleef deze mede-reactie achterwege, waardoor de specifieke structuur der canicola bijzonder duidelijk tot uiting kwam. Er waren echter ook patiënten, waarbij de sero-reacties met beide stammen, althans tijdelijk, even hoog waren. Dan was de serologische diagnose alleen mogelijk, door af te wachten, voor welken stam het serum op den duur een belangrijk hooger titer kreeg, of door de verzadigingsproef te verrichten; ook hiermede kan de specifieke van de onspecifieke reactie onderscheiden worden.

In het volgende worden alleen de reacties bij lijders aan de klassieke ziekte van Weil besproken. Enkele malen gaven verschil-

lende klassieke stammen met dezelfde sera afwijkingen in de hoogte van den titer. In die gevallen, werden meerdere stammen in het onderzoek betrokken en werd de hoogst verkregen titer als de juiste aangenomen. Dergelijke verschillen tusschen de klassieke stammen zijn niet constant en vormen geen aanleiding den klassieke verwekker der ziekte van Weil in allerlei serologische gescheiden soorten in te deelen. Hun overeenstemmende antigene eigenschappen blijken in het algemeen uit het voortgezette onderzoek (zie Hoofdstuk VII en VIII).

Uit het geheele materiaal werd van 304 patiënten de dag, waarop de ziekte begon, medegedeeld. Alle bij hen gevonden titers zijn vereenigd in tabel 3. Hierin staan de aantallen reacties van overeenstemmenden titer en ziektedag. Als voorbeeld dienen de 9 sera afkomstig van den 4den ziektedag, deze gaven 8 negatieve reacties en 1 van 1:10.

Het titerverloop van elken patiënt afzonderlijk is in deze tabel niet te volgen; de grenzen, waarbinnen de titers van alle patiënten zich bewogen, zijn er echter min of meer in bepaald.

Van de 95 sera uit de eerste ziekte-week, grootendeels in de laatste dagen dezer week ontnomen, is de reactie in 60 gevallen negatief. Zelfs bij 19 van de 60 sera van den 8sten en 9den dag blijft de reactie achterwege.

Daarentegen reageerden reeds 1 op den 3den dag, 1 op den 4den, 4 op den 5den, 11 op den 6den, 17 op den 7den, 21 op den 8sten en 19 op den 9den dag positief.

Gedurende de tweede week verdwijnen de zwak positieve titers geleidelijk; de meesten behalen een titer tusschen 250 en 5000. Slechts 10 van de 145 sera uit de tweede week hebben reeds een zeer hoogen titer (10000 en 25000). De twee tusschen haakjes geplaatste reacties vallen wat buiten het kader; wellicht kan dit worden teruggebracht op een verkeerde opgave van den ziektedag of op een andere fout.

In den loop van de 3de en 4de week zien we geen reacties meer van 1:100 en lager.

Gedurende de 3de week reageeren van de 122 sera 25 tot ongeveer 1:300 en 12 tot minstens 1:25000. De overige titers lagen hier tusschen. In de 4de week zijn totaal 85 sera onderzocht, hiervan was de titer bij 6 omstreeks 300 en bij 29 minstens 25000.

De 85 titers uit de 2de maand laten een nog toegenomen verschuiving naar den hoogen kant zien, slechts 3 van 300 en 42 van 25000 of meer.

TABEL 3. Sero-reacties van 304 Weil-patiënt

TIJDEN, WAAROP HET BLOED ONTNOMEN WERD																						
		EERSTE WEEK							TWEEDE WEEK							DERDE WEEK						
Dagen:		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
T I T E R	25000 en hooger	}												1	1		2	1	1	3	3	1
	10000								(1)		1		3	3	1		6	2	5	2	2	
	5000	}																				
	3000						(1)	1	1	6	3	5	8	5	10	7		6	3	6		
	2500																					
	1000								1	4	7	1	6	4	8	5	7	3	3	3	2	
	500	}																				
	300					2	1	4	5	7	14	1	8	2	3	7	3	2	2	5	4	
	250																					
	100					1	1	6	8	2	3	1	1	2	3							
	50	}																				
	30					1	5	6	4	4	1	1	2									
	25																					
	10			1	1		4	1	2	1												
	0		1	1	4	8	11	23	12	13	6											
Totaal		1	1	5	9	15	35	29	35	25	32	7	26	20	20	24	24	8	19	16	15	

Binnen de eerste twee weken bereiken een titer van 10000 of meer 6 %, in de derde week 28 %, in de vierde week 48 % en in de tweede maand 72 %. M.a.w. tot en met de 8ste week loopt de concentratie der door de sero-reactie aantoonbare anti-lichamen nog in een stijgende lijn. Of dit nog langer duurt, is uit ons materiaal niet te zien. Men kan tot minstens de 8ste week verwachten den maximalen titer aan te treffen.

Als men veronderstellen mag, dat de beschermende stoffen in het serum dezelfde lijn volgen, kan men met het afnemen van reconvalescenten-serum, dat men voor therapeutische doeleinden wil verzamelen, minstens 8 weken wachten; een tijdstip waarop de patiënt gewoonlijk weer voldoende op krachten is gekomen. Kisker (1935) vond bij 21 patiënten den hoogsten titer meestal tusschen den 30sten en 50sten dag. Deze periode beschouwt ook zij als de beste voor het afnemen van reconvalescenten-serum.

waarvan het begin der ziekte vaststaat.

: DAG WAAROP DE ZIEKTE BEGON.

VIERDE WEEK						Tweede maand	Derde maand	Vierde tot twaalfde maand	Tweede jaar	Later	TOTAAL
23	24	25	26	27	28						
6	8		6	1	5	42	4				89
	3	2	1	1	3	19		3			65
7		4		1	1	18	4	2			110
2	3	2	2	2	2	3		4	1	1	85
1	1	1		1		3		5	3	8	97
									1		29
											24
											10
											79
16	15	9	9	6	11	85	8	14	5	9	588

Zimmermann en Arjona (1934) geven op, dat er blijkens hun proeven met caviae een groote parallelliteit bestaat tusschen den titer en de beschermende werking van de sera.

De cijfers van de 4de tot de 12de maand wijzen op een duidelijke daling van den titer; in de volgende jaren komt deze op een nog lager niveau. Onder deze late reacties bevindt zich in hoofdzaak het door Postmus verzamelde materiaal.

In de besproken tabel trekt verder de aandacht, dat op gegeven tijdstippen de waarden der titers tamelijk ver uit elkaar liggen. Dit zou ten eerste zijn oorzaak kunnen hebben in het feit, dat hieronder zoowel zware als lichte gevallen begrepen zijn met de mogelijkheid, dat de titer evenredig met de intensiteit der ziekte loopt. Een tweede invloed daarop zou in het geven van immuun-serum kunnen bestaan. Beide punten zullen in het volgende worden besproken.

TABEL 4. Sero-reacties van patiënten met icterus.

Nummer van de patient	TITERS OP DE VERSCHILLENDE TIJDSTIPPEN;											
	EERSTE WEEK					TWEDE WEEK						
	t/m 4e dag	5e dag	6e dag	7e dag	8e dag	9e dag	10e dag	11e dag	12e dag	13e dag	14e dag	
1												
2a												
3						250			5000			
6						50						
16							500					
25					25							
27				100		500						
41								50				
58												
112										1000		
259												
280												
286						300	> 300					
330									30		100	
2												
4				25			500					
5												
15						1000			5000			
24			50									
66												
75									> 500			
76										2500		
80												
89	10 (3)					> 25						
98												
134												100
143	(4)											
180							100					
182	(4)											
184												
186												
195												
220	(4)									10000		
241			> 10							3000		
242												
246												
248												
270	(3)						1000					
285												
289												
290					30							
295	10 (4)						3000					
306												
316	(4)											
329												100
332									300			

waarbij **de verwekkers** werden aangetoond.

EERSTE DAG IS DE DAG VAN HET BEGIN DER ZIEKTE				
DERDE WEEK	VIERDE WEEK	TWEEDE MAAND	L A T E R	Overleden aan de ziekte
titer — dag	titer — dag	titer — dag	titer — dag	
	50000 — 24			10e dag
				52e „
				12e „
				9e „
				13e „
				8e „
				10e „
				21e „
				12e „
				13e „
				8e „
				9e „
				10e „
				14e „
5000 — 15	25000 — 26	10000 — 44	1000 — 365	
10000 — 17		5000 — 45		
			5000 — 180	
10000 — 18		25000 — 32		
1000 — 21		50000 — 43		
> 50000 — 19				
2500 — 19		> 50000 — 46		
	> 25000 — 24		1000 — 381	
		2500 — 32		
		2500 — 29		
300 — 16		3000 — 48		
10000 — 21				
1000 — 18				
300 — 19	> 30000 — 26			
1000 — 19				
	> 3000 — 27			
10000 — 16		> 30000 — 29		
	30000 — 24			
> 1000 — 17				
1000 — 21				
	1000 — 27			
	> 1000 — 25			
	> 3000 — 25			
3000 — 19				
10000 — 21		30000 — 29		
3000 — 18		30000 — 51		
	300 — 24	10000 — 44		
	10000 — 26			

waarbij **de verwekkers** werden aangetoond.

EERSTE DAG IS DE DAG VAN HET BEGIN DER ZIEKTE.

DERDE WEEK	VIERDE WEEK	TWEEDE MAAND	L A T E R
------------	-------------	--------------	-----------

titer — dag	titer — dag	titer — dag	titer — dag
-------------	-------------	-------------	-------------

	250 — 27		
	5000 — 22	5000 — 42	
5000 — 21		25000 — 31	
10000 — 21		} > 50000 — 36	
		{ 50000 — 60	
> 50000 — 16			
> 5000 — 20			
2500 — 18			
2500 — 19			
5000 — 16	5000 — 22	5000 — 58	100 — 423
		} > 30000 — 32	
		{ 30000 — 54	
1000 — 16	1000 — 24		
300 — 19			
> 1000 — 16			
		3000 — 34	
3000 — 15			
		> 30000 — 37	
	30000 — 26		{ > 3000 — 150
			{ 300 — 203
10000 — 19		> 30000 — 36	
10000 — 20			
3000 — 15			
10000 — 16			
300 — 15	300 — 23		1000 — 133
3000 — 16			
	10000 — 25		
1000 — 15	3000 — 28		

HOOFDSTUK III.

Sero-reacties van patiënten, waarbij leptospirae werden aangetoond; onderscheiden in gevallen met en zonder icterus.

Zooals we hiervoor zagen, zijn bij 87 patiënten de verwekkers der ziekte aangetoond. Bij 2 hunner bleek een infectie met canicola in het spel te zijn, bij alle overigen was het de klassieke leptospira.

In tabel 4 zijn degenen opgenomen, die icterus hadden, in tabel 5, zij die geen icterus hadden. Daar van 10 lijders niet bekend was op welken dag de ziekte begon, of hoe het met den icterus gesteld was, zijn deze, evenals de twee canicola-patiënten buiten beschouwing gelaten.

Deze tabellen hebben een dubbele beteekenis:

- a. Daar de verwekker kon worden aangetoond, is bij hen de diagnose volkomen zeker.
- b. De splitsing in gevallen met en zonder icterus beteekent tegelijk een scheiding in zwaardere en lichtere gevallen. Immers alleen patiënten met icterus leveren doodsgevallen (volgens ons materiaal ongeveer 18 %). Zonder icterus is het verloop, al kan het er in het begin der ziekte dreigend uitzien, steeds gunstig.

Tabel 4 geeft de titers van 46 patiënten met icterus. Bovenaan staan 14 hunner, die aan de ziekte succombeerden (daaronder één, die pas op den 52sten dag overleed aan een nierlijden in aansluiting aan de ziekte).

Deze 14 mogen aan een afzonderlijke bespreking worden onderworpen. Hun sero-reacties demonstreeren op overtuigende wijze, hoe moeilijk het soms kan zijn, daaruit voor de diagnose conclusies te trekken. In vele gevallen kan de lage titer wel tot verdenking voeren, doch niet als bewijs voor de infectie dienen. Bij 8 van deze 14 personen werd een titer van 300, dien we als grens aannamen, niet bereikt. Was dus in deze gevallen de verwekker niet aangetoond, dan was de diagnose dubieus gebleven.

Wel kan dan voor de ziekte van Weil pleiten het klinische beeld, dat soms geen andere diagnose veroorlooft, en na den dood de pathologische anatomie, vooral het microscopische onderzoek van de

lever. Van dit orgaan, dat wegens den icterus in het brandpunt der belangstelling staat, is meestal het weinig abnormale beeld het meest typeerend. De structuur lijkt soms zoo op de normale, dat men bepaald naar afwijkingen zoeken moet. In andere gevallen bestaat een desintegratie der levercellen, die onmiddellijk de verdenking op Weil wekt. Vettige degeneratie (of vet-infiltratie) kan geheel ontbreken; of wanneer ze aanwezig is, bereikt ze toch nooit den graad, dien we b.v. bij de gele-koorts levers waarnemen, die bovendien nog gekenmerkt zijn door uitgebreide necrotische processen. Wel is altijd opvallend het voorkomen van kerndeelingen in de parenchymcellen; vooral door Prof. Snijders wordt dit op den voorgrond gesteld. Om deze te zien moet men er een open oog voor hebben.

Het ontbreken van grove weefselveranderingen in de lever geeft dus al direct aanleiding aan de ziekte van Weil te denken.

Soms gelukt het ook de leptospirae in de lever of, met nog grootere kans, in de nieren aan te toonen, regel is dit echter niet. Men moet dus de diagnose post mortem vooral niet van de aanwezigheid van leptospirae laten afhangen.

Na het vorige hoofdstuk is aan de tabellen 4 en 5 weinig toe te voegen. Ook bij deze gevallen werd op een betrekkelijk laat tijdstip wel eens een reactie van 1 : 300 gevonden. Daarna blijkt de titer nog belangrijk te kunnen stijgen; als voorbeeld diene patiënt No. 329 van tabel 4, waarbij de titer van 300 op den 24sten dag opliep tot 10000 op den 44sten dag.

Hoewel bij de vergelijking der tabellen 4 en 5 geen onderlinge verschillen in de titers opvallen, is in de beide volgende lijsten de inhoud in meer overzichtelijken vorm weergegeven.

TITERS	D A G E N									
	1-6	7, 8	9, 10	11, 12	13, 14	15-18	19-23	24-28	29-60	
25000 en hooger							1	5	6	
10000					1	3	2	1	2	
2500, 3000 en 5000			1	2	2	2	2	2	4	
1000			2		1	2	3	2		
250, 300 en 500			6	2		1	1	1		
100		1	1		3					
25, 30 en 50	1	3	2	2						
10	3									
0	15	7	1							

Ontleend aan tabel 4, patiënten met icterus.

TITERS	D A G E N								
	1-6	7, 8	9, 10	11, 12	13, 14	15-18	19-23	24-28	29-60
25000 en hooger						1		1	5
10000				1		1	3	1	
2500, 3000 en 5000				2	1	5	5	1	3
1000			1	1		3		1	
250, 300 en 500		1	3			1	2	1	
100					2				
25, 30 en 50				1					
10									
0	10	1	1						

Ontleend aan tabel 5, patiënten zonder icterus.

Uitgesproken verschillen tusschen beide groepen zijn ook zoo niet te ontdekken. Ondanks de kleine cijfers op beide staatjes benaderen de grenzen, waarbinnen de reacties plaats vonden, die van tabel 3; de stijging der titers tot in de 2de maand komt ook bij beide groepen tot uiting.

Uit het voorgaande blijkt dus geen verschil tusschen de titers van patiënten met en zonder icterus.

HOOFDSTUK IV.

Titers bij de overige Weil-patiënten.

Bij 243 patiënten gaf alleen de sero-reactie een bevestiging der klinische diagnose. De titers, waarop deze uitspraak steunde, worden in de tabellen 6 (A en B) en 7 (A en B) opgegeven, gerangschikt naar de hoogte en gegroepeerd als volgt:

1. Overledenen (tabel 6 A), tezamen 22 gevallen.

Zooals te verwachten is na het voorgaande, zijn hieronder verschillende, waarbij de reactie geen zekerheid brengt. Immers bij 10 blijft de titer onder 300; toch kan bij 2 hiervan nog een stijging van den titer worden waargenomen (nos. 113 en 328). Bij de overigen geeft de reactie meer houvast. Het fraaiste serologische bewijs in deze groep behoort bij patiënt no. 102, wiens titer van 0 op den 6den dag tot 10000 op den 13den dag gekomen was.

Gevallen met alleen negatieve reacties, zooals ze op tabel 4 verschijnen, ontbreken hier. Dit doet het vermoeden opkomen, dat er zulke gevallen wel geweest zijn, echter niet herkend, omdat met het ontbreken eener sero-reactie bij negatief bacteriologisch onderzoek en achterwege gebleven obductie, de diagnose onmogelijk was.

2. Herstelden met elk één reactie (tabel 6 B).

In totaal omvat deze groep 75 personen. Onder degenen met vrij lage titers zijn er 4, waarbij de reactie na de 4de maand gebeurde, (nos. 83, 177, 25a, 235) op een tijdstip, waar de titer reeds gedaald kan zijn; bij dezen werd pas achteraf aan Weil gedacht. Aan de overigen behoeft niets te worden toegevoegd.

3. Herstelden met meerdere reacties (tabel 7).

A. Een groep van 117 gevallen, die het cardinale punt der serologische diagnose, de titerstijging, tot achtergrond heeft.

Duidelijkheidshalve zijn deze onderverdeeld in:

- a. 43 gevallen, waarbij de eerste reactie negatief was;
- b. 74 gevallen, waarbij de eerste reactie positief was.

TABEL 6. Overzicht der sero-reacties bij patiënten, waar **geen** verwekker werd aangetoond.

A. Sero-reacties van overleden patiënten					B. Patiënten, waarbij de reactie éénmaal werd verricht					
Nr. pat.	Dag	Laagste titer	Dag	Hoogste titer	Nr. pat.	Dag	Titer	Nr. pat.	Dag	Titer
113	8	—	13	100	83	590	300	278	± 60	3000
183	8	—	12	300	251	10	300	279	?	3000
102	6	—	13	10000	259	8	300	284	?	3000
328	6	10	10	100	304	6	300	74	?	5000
245	7	30			313	10	300	51	?	10000
264	8	30			165	31	300	69	?	10000
12	7	50			177	140	300	101	27	10000
243	?	100			272	19	300	126	8	10000
68	6	100			17	± 30	500	154	18	10000
71	5	100			25a	± 365	1000	185	14	10000
105	7	100			65	?	1000	202	10	10000
222	9	100			119	20	1000	209	13	10000
43	7	250			164	21	1000	226	40	10000
62	12	250			260	12	1000	230	36	10000
252	10	300			263	9	1000	261	± 21	10000
275	8	300			277	24	1000	268	56	10000
208	19?	300			283	± 60	1000	310	36	10000
343	?	300			235	120	1000	8	24	25000
346	14	300			7	15	2500	9	20	25000
16	10	500			19	14	2500	37	29	25000
233	11	1000			22	15	2500	67	18	25000
14	14	2500			48	12	2500	104	15	30000
					82	20	2500	181	?	30000
					109	15	3000	199	13	30000
					139	9	3000	237	45	30000
					142	16	3000	287	± 42	30000
					144	?	3000	297	15	30000
					150	23	3000	314	19	30000
					151	18	3000	129	28	> 30000
					152	60	3000	159	22	> 30000
					161	12	3000	174	23	> 30000
					167	22	3000	229	± 30	> 30000
					168	37	3000	315	22	> 30000
					175	15	3000	26	70	> 50000
					176	80	3000	50	26	> 50000
					178	65	3000	10	53	100000
					193	10	3000	10a	81	500000
					238	20	3000			

Patienten, waarbij de reactie meermalen werd verricht; duidelijke titerstijging

TABEL 7 (A). Vervolg overzicht bij patienten, waar geen verwekker werd aangetoond.

Nr. patient	Dag	Laagste titer	Dag	Hoogste titer	Nr. patient	Dag	Laagste titer	Dag	Hoogste titer	Nr. patient	Dag	Laagste titer	Dag	Hoogste titer
93	8	—	25	300	78	± 10	—	± 26	50000	120	20	300	30	3000
162	7	—	21	300	45	9	—	29	> 50000	219	7	300	18	3000
137	7	—	27	1000	60	8	—	24	> 50000	240	?	300	? + 13	3000
169	7	—	19	1000	311	5	—	29	300000	274	18	300	38	3000
200	8	—	12	1000	249	7	10	10	1000	292	8	300	18	3000
208	9	—	14	1000	94	8	100	24	1000	326	8	300	37	3000
244	8	—	28	1000	135	8	100	17	1000	132	17	300	25	3000
266	?	—	? + 8	1000	312	7	100	15	1000	212	13	300	23	3000
299	5	—	19	1000	133	8	100	16	> 1000	70	10	250	14	5000
145	7	—	16	1000	140	9	100	16	> 1000	90	12	250	15	5000
158	7	—	22	1000	85	8	100	18	1000	88	9	1000	32	5000
96	7	—	22	3000	21	8	100	22	2500	192	16	300	39	10000
121	?	—	13	3000	118	6	10	16	3000	239	5	300	30	10000
123	4	—	? + 21	3000	323	9	10	16	3000	303	9	300	16	10000
197	6	—	20	3000	342	?	10	? + 17	3000	338	?	300	? + 24	10000
223	7	—	23	3000	298	6	30	13	3000	288	12	300	29	10000
225	6	—	16	3000	141	9	100	22	3000	53	5	500	25	10000
257	6	—	13	3000	114	8	100	19	3000	138	13	1000	37	10000
302	?	—	? + 10	3000	156	7	100	23	3000	146	17	1000	39	10000
324	6	—	21	3000	341	8	100	23	3000	345	13	1000	22	10000
215	8	—	14	3000	124	7	30	13	3000	31	20	250	38	25000
47	6	—	12	10000	35	7	100	10	> 3000	13	15	500	19	25000
79	6	—	28	10000	217	8	10	30	5000	38	7	2500	39	25000
91	8	—	28	10000	122	6	30	21	10000	63	?	5000	? + 34	> 25000
155	6	—	19	10000	227	7	30	17	10000	196	7	300	12	30000
221	5	—	16	10000	30	6	50	24	10000	189	9	300	24	30000
224	9	—	16	10000	340	8	100	18	10000	99	14	1000	27	30000
231	4	—	21	10000	64	10	25	23	25000	103	12	1000	23	30000
300	6	—	24	10000	40	7	100	23	25000	281	15	1000	45	30000
307	5	—	21	10000	61	9	100	28	25000	128	10	1000	23	30000
309	6	—	20	10000	204	9	100	33	25000	273	12	1000	52	30000
39	6	—	29	25000	318	5	30	41	30000	194	14	3000	44	30000
254	5	—	18	30000	191	6	30	17	30000	163	8	1000	18	30000
301	?	—	? + 30	30000	170	6	10	28	30000	187	23	1000	35	> 30000
296	?	—	? + 19	30000	115	8	30	26	> 30000	214	12	3000	26	> 30000
157	5	—	± 35	> 30000	20	7	25	21	> 30000	234	13	3000	42	> 30000
198	6	—	40	> 30000	44	9	25	28	> 50000	29	20	500	30	50000
228	9	—	30	> 30000	56	8	50	61	> 50000	55	10	250	29	> 50000
										10b	20	1000	34	250000

Een ? beteekent, dat de ziektedag onbekend is; een + daarachter beteekent, dat de reactie een zeker aantal dagen later herhaald werd.

TABEL 7 (B). Als A; geen duidelijke titerstijging waargenomen.

Nr. patiënt	Dag	Titer	Dag	Titer	Nr. patiënt	Dag	Titer	Dag	Titer
92	11	300	22	300 ?	322	21	3000	29	3000
255	12	300	200	> 300	305	10	1000	16	> 3000
49	9	250	14	1000	100	11	3000	41	> 3000
293	7	300	15	1000	46	10	2500	45	10000
333	17	1000	36	1000	166	18	3000	30	10000
148	10	3000	20	1000	211	10	3000	18	10000
334	10	300	25	> 1000	325	21	3000	35	10000
331	10	> 300	14	> 1000	332	15	3000	28	> 10000
336	21	> 300	28	> 1000	344	25	3000	33	> 10000
81	14	1000	22	> 1000	130	18	10000	29	30000
160	11	3000	22	> 1000	339	16	10000	23	30000
125	9	1000	22	3000	32	?	50000	? + 6	50000
127	10	1000	23	3000	28	23	> 100000	31	50000
136	21	1000	31	3000	201	22	> 10000	29	100000
108	16	> 1000	32	3000					

B. Een groep van 29 patiënten, waarbij uit de reacties geen duidelijke titerstijging bleek. Hieraan zijn ook de gevallen toegevoegd, waarbij de titers slechts één eenheid hoger was. Bij patiënt no. 255 zullen waarschijnlijk hogere titers tusschen den 12den en 200sten dag aanwezig geweest zijn.

Uit bovenstaand materiaal blijkt duidelijk, welke beteekenis de titerstijging voor de serologische diagnose van de ziekte van Weil heeft. Vooral als de reactie den eersten keer een negatieven uitslag oplevert; dan kan immers ook een vroegere infectie geheel buiten beschouwing blijven.

HOOFDSTUK V.

Sero-reacties na toediening van anti-Weil-serum.

1. Heeft inspuiting van anti-serum invloed op het titer-verloop bij Weil-patiënten?

In Hoofdstuk III bleek de ernst der infectie, waarvoor we het al of niet optreden van icterus als maatstaf namen, geen invloed op den aanmaak van agglutinin en lysinen te hebben.

Om nu den invloed van toegediend anti-serum na te gaan, zijn de patiënten, waarbij op bekende ziekte-dagen een zekere hoeveelheid hoogwaardig anti-Weil-serum werd ingespoten op t a b e l l e n 8 en 9 samengebracht. De eerste tabel omvat de gegevens van 40 personen, die tevens icterus hadden, de laatste die van 7 zonder icterus. De ziekte-dagen, waarop de injecties plaats vonden, zijn door een sterretje aangeduid. Geheel rechts zijn de hoeveelheden gegeven anti-serum vermeld.

In tabel 8 is ook van elken patiënt de dag opgegeven, waarop de icterus werd bemerkt. Deze dagen vallen bij 13 patiënten samen met die, waarop de eerste injecties plaats vonden. Bij de overigen begon de anti-serum therapie 1 tot 6 dagen na het verschijnen der icterus.

De injecties geschieden voor het meerendeel op den 6den, 7den en 8sten ziekte-dag, meestal werd 40 ccm. anti-serum per keer toegediend en wel op 2 of 3 achtereenvolgende dagen.

Bij de grootendeels sporadische ziektegevallen is het veelal de beginnende icterus, die de gedachte opwekt met een geval van Weil te doen te hebben. Bij epidemieën is men uit den aard der zaak eerder gewaarschuwd. De vroege diagnose heeft dus haar moeilijkheden, en dat verklaart ons het groote aantal laat, men kan gerust zeggen voor therapeutisch effect te laat, gegeven serum-injecties. Immers vooral de toediening van anti-serum in de eerste dagen der ziekte is zoowel bij den mensch als bij de cavia in het dier-experiment (Uhlenhuth e.a.) het meest werkzaam.

De titers van deze 40 patiënten wijken niet af van het algemeene schema (tabel 3). De reacties zijn hieronder weer overzichtelijk opge-

TABEL 8. Reacties van patiënten met icterus

Nummer van de patient	TITERS OP VERSCHILLENDE TIJDSTIPPEN									
	EERSTE WEEK					TWEDE WEEK				
	3e dag	4e dag	5e dag	6e dag	7e dag	8e dag	9e dag	10e dag	11e dag	12e dag
89	10						*	> 25	*	
124					30 *					
125					*	*	1000 *			
137					— *	*				
140						*	100			
145					— *					
157				*	*					
158					*					
163						1000 *	*			
182		*	*	*						
183							— *			300 *
186				— *	*					
195			*							
196				*	300 *					300 *
197				— *	*					
204						*	> 10	*		
209					*	*				
217					*	10 *			3000	
220		— *	*							
223					*	*			100	
224							— *	*		
226				*	*					
234						*				
241			*	> 10 *						
242					— *					
248						*		*		
257				— *	*					
259			*	*						
264					*	> 30 *				
269					*	300 *				
275			*	*		300 *				
285				*	*					
289				*						
290					*	30 *				
302						— *				
306			*	*	*					
312					> 100 *		*		*	
328				10 *	*	*	*	100		
329				— *	*	*	*	*		
330				— *	*		—			300 *

* = dag van serum-toediening.

e met anti-serum zijn behandeld.

EERSTE DAG IS HET BEGIN DER ZIEKTE

Tweede week		Derde week	Vierde week	Tweede maand	Dag waarop icterus werd gezien	Hoeveelheid anti-serum in ccm.
1e dag	14e dag	titer — dag	titer — dag	titer — dag		
				2500 — 29	8	2 × 40
3000					5	2 × 40
			3000 — 22		4	3 × 40
		300 — 18	1000 — 27		6	50 + 2 × 40
		> 1000 — 16			4	40
		> 1000 — 16			6	20
		300 — 15		> 30000 — 36	5	3 × 40
			> 1000 — 22		7	3 × 40
		> 30000 — 18			7	2 × 40
		> 1000 — 19			4	3 × 20
					6	80
		10000 — 16			6	3 × 40
0000				> 30000 — 29	2	25
					5	2 × 40
		3000 — 20			4	2 × 40
		300 — 15		30000 — 33	5	2 × 20
0000					5	2 × 40
				10000 — 30	6	20 + 40
			30000 — 24		4	2 × 40
			3000 — 23		6	2 × 40
		10000 — 16			3	2 × 40
				10000 — 40	6	2 × 20
3000		3000 — 20		30000 — 42	4	50
3000		> 1000 — 17			4	2 × 40
		1000 — 21			7	40
			1000 — 27		?	2 × 40
3000					6	2 × 40
					5	2 × 40
					5	2 × 40
					5	2 × 40
					4	40 + 20
			> 1000 — 25		6	2 × 40
			> 3000 — 25		3	20
		3000 — 19			7	2 × 40
		3000 — 18			7	20
		3000 — 18		30000 — 51	5	20 + 3 × 40
		1000 — 15	1000 — 22	100000 — 41	7	3 × 40
					± 3	4 × 60
> 100			300 — 24	10000 — 44	5	5 × 20
100					3	2 × 60

geven. Ter vergelijking volgen de groepen van patiënten, van wie bekend is, dat ze geen anti-serum ontvingen: 46 met en 58 zonder icterus.

TITERS	D A G E N								
	1-6	7, 8	9, 10	11, 12	13, 14	15-18	19-23	24-28	29-60
25000 en hooger				1		1		1	6
10000					2	2			3
2500, 3000 en 5000				1	4	2	5	1	1
1000		1	1			4	4	3	
300		3		1		3		1	
100		1	2	1	2				
25, 30 en 50		3	1	1					
10	3	1	1						
0	12	9	3						

Ontleend aan tabel 8; reacties van 40 patiënten met icterus, waarbij anti-serum werd toegediend.

TITERS	D A G E N								
	1-6	7, 8	9, 10	11, 12	13, 14	15-18	19-23	24-28	29-60
25000 en hooger						2	4	1	7
10000				1		3	1	1	6
2500, 3000 en 5000		1		1	2	4	4	1	3
1000				4	1	3		1	1
250, 300 en 500	1		2	4		1	4		
100		2			2				
25, 30 en 50		1							
10		1	1						
0	3	6	1						

Reacties van 46 patiënten met icterus; geen anti-serum toegediend.

Uit bovenstaande gegevens is tusschen de tenslotte bereikte titers der drie groepen geen principieel verschil op te maken. Tevens zien we hier nogmaals, dat patiënten met en zonder icterus nagenoeg overeenkomen.

Wél verdient de bijzondere aandacht, dat bij de patiënten no's 259, 306 en 330 de sero-reactie daags na de inspuiting van een flinke dosis serum negatief was (zie blz. 44).

Een positieve uitwerking echter van de passieve immunisatie op het verloop der actieve immunisatie, wij herhalen het, valt uit deze tabel niet te lezen.

TITERS	D A G E N								
	1-6	7, 8	9, 10	11, 12	13, 14	15-18	19-23	24-28	29-60
25000 en hoger					1	1	1	1	7
10000		(1)		1		4	4	3	2
2500, 3000 en 5000			2	3	3	5	6	3	4
1000			1	1	1	4	5	3	1
250, 300 en 500		1	2	2	2	3	3	1	1
100		4		1	1				
25, 30 en 50	2								
10		1							
0	14	4	1						

Reacties van 58 patiënten zonder icterus; geen anti-serum toegevend.

Tabel 9 geeft de reacties van 7 lijdens zonder icterus na behandeling met immuun-serum. Twee hunner, no's 141 en 164 kregen de eerste injectie pas op resp. den 9den en 8sten dag, dus op een tijdstip, waarop icterus niet meer pleegt te verschijnen!

Anders staat het met de overige 5 gevallen; drie hunner kregen de eerste injectie vóór den 4den ziektedag, twee (no's 108 en 165) resp. op den 4den en 5den dag. Bij deze patiënten was een naderhand optredende icterus niet uitgesloten geweest.

Hoewel dit kleine getal geen bewijs vormt, dat *vroegtijdige* serumtoediening het optreden van icterus voorkomt, toch is het belangrijk genoeg om er aandacht aan te schenken; temeer, omdat tegenover deze 5 geen enkel geval staat, waarbij de vroeg gegeven seruminjectie de icterus *niet* voorkomen kon. Het zou zeer toevallig geweest zijn, als deze 5 patiënten allen van huis uit tot de lichte, zonder icterus verlopende gevallen behoord hadden.

Met terzijdestelling van patiënten no's 141 en 164, waarbij trouwens slechts tot op den 22sten dag een reactie werd verricht, zien we bij deze groep geen titers hooger dan 5000; ook niet onder de drie reacties, die gedurende de 2de maand werden afgelezen. Mogelijk dat ook hierbij het toeval in het spel geweest is; het kan echter ook zijn, dat *vroegtijdige* serum-injectie het optreden van hooge titers verhindert. Deze mogelijkheid is theoretisch te verdedigen. Vroegtijdige

TABEL 9. Reacties van patiënten **zonder icterus**, die met **anti-serum** zijn behandeld.

Nr. patiënt	TITERS OP VERSCHILLENDE TIJDSTIPPEN											
	Eerste week						Tweede week		Derde week		Vierde week	
	1e dag	2e dag	3e dag	4e dag	5e dag	6e dag	8e dag	9e dag	10e dag	titer — dag	titer — dag	titer — dag
84	*		*			*				5000 — 16	5000 — 22	5000 — 58
108				*	*					> 1000 — 16		3000 — 32
141								100*	*		3000 — 22	
164							*	*		1000 — 21		
165					*							> 300 — 30
256	*									300 — 15	300 — 23	1000 — 133
326		*					300			1000 — 18	3000 — 27	
												20
												?
												20

* = dag van serum-toediening.

toediening van immuun-serum beperkt immers het aantal leptospirae in het geïnfecteerde organisme, hierdoor worden allicht minder antilichamen gevormd, dan in de onbehandelde gevallen, waarbij de leptospirae zich kunnen vermenigvuldigen, totdat in het lichaam zelf stoffen ontstaan, die de ziekte-verwekkers aantasten. In die gevallen echter, waarbij het serum betrekkelijk laat wordt gegeven, zooals die uit tabel 8, heeft het lichaam veelal zelf reeds de vernietiging der leptospirae ter hand genomen. De passieve immunisatie zal bij hen weinig invloed meer hebben op de totale hoeveelheid leptospirae en den behaalden titer.

2. *Reacties bij patiënten, niet lijdende aan de ziekte van Weil.*

Vanaf 1932 tot en met 1936 werden sero-reacties verricht van vele patiënten, die blijkens de uitkomsten en de verdere observatie niet aan de ziekte van Weil leden. Enkele onzekere gevallen, waarover onze inlichtingen onvoldoende waren, zijn buiten beschouwing gebleven.

Bij 591 personen hadden de reacties een negatieven uitslag. Bij 9 echter was de reactie zwak positief, hoewel ook bij hen het verdere verloop de ziekte uitsloot. Deze 9 gevallen mogen hieronder volgen:

a. In t a b e l 10 zijn de reacties van 6 hunner opgenomen. De eerste 3 personen toonden 1 à 2 weken na de eerste zwak positieve reacties weer negatieve proeven. De interpretatie hiervan stuit op geen moeilijkheden; daar de kliniek en de serologische reactie elkander dekten en van de ziekte van Weil geen sprake kon zijn, hebben wij hier beslist met onspecifieke reacties te doen.

Onder de drie andere patiënten werd bij één (no. 291) de hoogste reactie, n.l. 1 : 100, gezien. Na 3 weken was de reactie nog even hoog. Hierbij zou men even in twijfel kunnen zijn, wat de reactie beteekende. Waar het contrôle-materiaal met 591 negatief reagerende patiënten een voldoende waarborg is voor de groote specificiteit der reactie, neigen we er in dit geval toe de reactie, wegens het gelijkblijven van den titer 100 op de twee genoemde tijdstippen, te beschouwen als de rest eener vroegere Weil-infectie.

Het serum der volgende (532) beïnvloedde slechts de canicola, hetgeen wij op dezelfde wijze zouden willen verklaren.

b. Aan de overige drie patiënten met zwak positieve sero-reacties werd tevoren anti-Weil-serum gegeven; ook bij hen bleek achteraf van Weil geen sprake te zijn. In tabel 11 zijn de titers dezer mensen opgegeven. Bij het eerste en tweede geval reageerde het

TABEL 10. Onspecifieke (en anamnestiche?) reacties.

P a t i è n t	Ziekte­dag	Sero-reactie met levende klass. stam		Sero-reactie met geformal. klass. stam		Sero-reactie met levende canicola-stam		Sero-reactie met geformal. canicola-stam	
		Naam stam	Titer	Naam stam	Titer	Naam stam	Titer	Naam stam	Titer
Aggl. Nr. 58	? ? + 9	Zaan Lith	25 10	Franken	—				
		Wijnberg	—	Franken	—				
Aggl. Nr. 598	? ? + 12	Wijnberg Kantorowicz	10 —	Wijnberg Deventer	10 —	H. Utr. IV H. Utr. IV	— —		
		Wijnberg Deventer Kantorowicz	> 10 — —	Deventer Wijnberg	10 —	Allarie	—		
Aggl. Nr. 291	20	Vermeulen Zaan	— —	Zaan De Baas	— 25	H. Utr. IV	—		
		Wijnberg De Koff Visscher Otte	10 100 100 100	Groeneveld Wigmore	25 25				
Aggl. Nr. 532	? ? + 4	De Baas Wijnberg Lith Otte	100 100 25 100	Zaan Wigmore	— 25	H. Utr. IV	—		
		Wijnberg Kantorowicz Wijnberg	— — —			Olaf H. Utr. IV H. Utr. IV Allarie	10 10 10 10	Olaf	—
Aggl. Nr. 1	± 50	Franken Zaan	> 50 > 10						

TABEL 11. Reacties bij niet-lijdens aan de ziekte van Weil na insputing met anti-serum.

Patiënt	Ziekte-dag	Anti-serum	Sero-reactie met levende klass. stam		Sero-reactie met geformal. klass. stam		Sero-reactie met levende canicola-stam		Sero-reactie met geformal. canicola stam	
			Naam stam	Titer	Naam stam	Titer	Naam stam	Titer	Naam stam	Titer
Aggl. Nr. 376	4	40 cc subc.	Zaan Zaan	10	Zaan Wijnberg	10	H. Utr. IV	--		
	11 15			--		--	H. Utr. IV	--		
Aggl. Nr. 969	6	20 cc subc.	Kantorowicz Kantorowicz Wijnberg Kantorowicz Eilders	30	Wijnberg Wijnberg Kantorowicz Wijnberg	30	H. Utr. IV	10	H. Utr. IV	--
	13			30		10	H. Utr. IV	10	H. Utr. IV	--
	20			30		100	H. Utr. IV	--	H. Utr. IV	--
Aggl. Nrs. 1060/62/70	6	30 cc i. ven. 10 cc i. musc.								
Serum Nrs. 553/569/577	7	35 cc i. ven. 15 cc i. musc.	Kantorowicz Kantorowicz Kantorowicz	100	Wijnberg Wijnberg Wijnberg	--	H. Utr. IV	30	H. Utr. IV	--
	8			30		--	H. Utr. IV	30	H. Utr. IV	--
	10			30		--	H. Utr. IV	--	H. Utr. IV	--
	16			30		--	H. Utr. IV	--	H. Utr. IV	--

serum een week na de serum-injectie (resp. 40 en 20 ccm.) zwak positief. Een resp. 7 en 4 dagen later verrichte sero-reactie leverde in beide gevallen een negatief resultaat op.

De derde patiënt op deze lijst ontving op 2 achtereenvolgende dagen tezamen 90 ccm. anti-serum, waarvan 65 intraveneus en 25 intramusculair. Den volgenden dag was de titer met een klassieken stam 100 en met *canicola* 30. Na 8 dagen, op den 16den ziektedag was nog geen negatieve reactie met *leptospira icterohaemorrhagiae* aanwezig, wèl daarentegen met *canicola*.

Het ligt voor de hand de zwak positieve reacties bij deze 3 personen aan de opgewekte, passieve immunisatie te wijten, temeer omdat onspecifieke reacties zeldzaam zijn (volgens a. bij 6 of minder van de 597, dus in hoogstens 1 % van de gevallen).

Verder is hier een tegenstelling met de vroeger genoemde gevallen van werkelijke ziekte van Weil, die één dag na de serum-injectie en ondanks deze toch een negatieve reactie vertoonden. Hierop komen wij later terug.

3. *Inspuiting van anti-serum bij konijnen.*

Daar het mogelijk was ook in het dier-experiment het voorafgaande na te bootsen, werd bij een aantal konijnen anti-serum ingespoten, en het verloop nauwkeurig nagegaan. Uit den aard der zaak konden hier de hoeveelheden serum relatief grooter zijn, dan die, welke aan menschen gegeven wordt. De uitslag kon hierdoor duidelijker worden.

Vier k o n i j n e n werden ingespoten met anti-Weil-serum equinum van een bekenden titer:

Datum	Konijn	Gewicht	Hoeveelheid anti-serum	Titer van het serum	Wijze van inspuiting
1—10—'35	1	3100 gram	10 ccm.	30000	intraveneus
7 10 '35	2	2000 „	7 „	30000	„
15—10—'35	3	2100 „	7 „	30000	„
16— 3—'36	4	2600 „	8½ „	100000	intramusculair

Aan de dieren werd dus per 300 gram lichaamsgewicht ongeveer 1 ccm. serum toegediend; de eerste drie werden intraveneus, de vierde intramusculair ingespoten. De laatste kreeg een tweewaardig immuun-serum, dat door gelijktijdige immunisatie met *leptospira icterohaemorrhagiae* en *leptospira canicola* van een paard gewonnen was.

Op bepaalde tijden na de injectie, namelijk na $\frac{1}{4}$, 1, 2, 3, 4, 5 en 6 uur en na 1, 2 en 3 maal 24 uur enz. werd wat bloed aan de konijnen ontnomen en hiermede de sero-reactie ingezet. De resultaten dezer proeven zijn in de volgende lijst verzameld.

Serum-onderzoek op onderstaande tijden na de serum-injectie	Konijn 1.	Konijn 2.	Konijn 3.	K o n i j n 4.	
	Sero-reactie met l. ict. haem.	Sero-reactie met l. ict. haem.	Sero-reactie met l. ict. haem.	Sero-reactie met l. ict. haem.	Sero-reactie met l. canicola
(vóór de proef)	0	0	0	0	0
15 minuten	1 : 1000	1 : 1000	1 : 1000	0	1 : 10
1 uur	1 : 1000	1 : 1000	1 : 1000		
2 „	1 : 1000	1 : 1000	1 : 500		
3 „	1 : 300	1 : 1000	1 : 500	1 : 50	1 : 100
4 „	1 : 300	> 1 : 300	1 : 250		
5 „	1 : 300	> 1 : 300	1 : 250		
6 „	1 : 300	> 1 : 300	1 : 250	1 : 250	> 1 : 250
1 × 24 uur	1 : 300	> 1 : 300	1 : 250	1 : 500	1 : 1000
2 × 24 „	1 : 300	1 : 300	> 1 : 100	1 : 250	1 : 1000
3 × 24 „	> 1 : 100	1 : 100	1 : 100	1 : 250	1 : 500
4 × 24 „	1 : 100	1 : 100		1 : 250	1 : 500
5 × 24 „		1 : 100		1 : 100	1 : 250
6 × 24 „	1 : 30		> 1 : 50		
7 × 24 „	1 : 30	1 : 30	1 : 50	> 1 : 25	> 1 : 50
8 × 24 „	1 : 10	0	1 : 25	1 : 10	1 : 25
9 × 24 „	1 : 10		1 : 25	0	0
10 × 24 „	0		1 : 10		
11 × 24 „			0		

In grafiek 12 is het verloop der passieve immunisatie bij deze dieren aanschouwelijk voorgesteld.

Vooropgesteld, dat de immuun-stoffen uit het serum quantitatief in het bloed, resp. lichaam van het konijn overgingen, kon men de volgende berekeningen maken om theoretisch de te verwachten concentraties te vinden. Als we aannemen, dat een konijn 6 % van zijn gewicht aan bloed heeft, zou het eerste dier (3100 gram) 183 gram bloed hebben, dit is bijna evenveel ccm. Dit bloed verdunt de 10 ccm. anti-serum 18 à 19 maal, zoodat we een titer van 30000 : 18 of circa 1600 moesten verwachten. Voor het geval, dat de anti-lichamen zich voornamelijk in het plasma zouden bevinden (ca. 55 % van het totale bloed) zou de theoretische waarde inplaats van 1600 op 3000 komen.

TABEL 12. Verloop der passieve immunisatie bij konijnen na intraveneuze en intramusculaire toediening.



Er zou dan in onze gevallen, waar na 15 minuten slechts 1000 gevonden wordt, reeds een aanzienlijke hoeveelheid uit het plasma, resp. serum verdwenen zijn (binding aan fixe cellen?).

Binnen 2 tot 4 uur treedt een verdere daling in tot 1:300, resp. 250. Op dit niveau blijft de titer de volgende twee dagen om dan binnen 8 à 10 dagen tot op een spoor na te verdwijnen.

Met deze proeven, waarin het vlugge verdwijnen der anti-lichamen bleek, voor zoover de sero-reactie dit aanwijst, is natuurlijk niet uitgemaakt of ook de beschermende stoffen voor het lichaam zijn verloren gegaan. Er zou, zooals reeds boven werd opgemerkt, een binding aan de lichaamscellen kunnen plaats vinden, die toch een zekeren graad van bescherming tegen de infectie verleend had. Hiervoor zouden proeven met andere proefdieren, die gevoeliger voor de infectie zijn dan het konijn, genomen moeten worden.

Uit de literatuur is bekend, dat caviae met hoogwaardig immuun-serum ingespoten gedurende eenigen tijd beschermd zijn tegen de infectie. U h l e n h u t h en F r o m m e zagen bij een proef met reconvalescenten-serum tot 6 dagen een beschermende werking, de op den 11den dag nageënte dieren werden daarentegen ziek. H a e n d e l, U n g e r m a n n en J a e n i s c h berichtten over een beschermingsduur van ruim 4 weken (1919). Deze onderzoekers meenden, dat de duur der beschutting afhankelijk is van den titer van het serum.

Na de intramusculaire injectie, bij konijn 4, zien we de menging van het bloed met het serum zich geleidelijk voltrekken. Na 6 uur was ze nog niet afgeloopen en was het maximum van den serum-titer 500, resp. 1000 met canicola, nog niet bereikt. Dit geschiedde pas na 24 uur. Daar dit tijdstip 18 uur van het voorafgaande verwijderd is, moeten we met de mogelijkheid rekening houden, dat de titer zelfs nog hooger geweest is. Overigens kwamen bij dit proefdier de reacties ongeveer overeen met die der intraveneus ingespoten dieren. Weliswaar zijn de waarden bij konijn 4 iets hooger, doch hierbij dienen we in aanmerking te nemen, dat het hier gebruikte anti-serum een hooger titer had, dan het aan de eerste drie dieren gegevene. Het verschil in hoogte der gelijktijdige reacties met canicola en de klassieke leptospira bij konijn 4, kan wellicht worden toegeschreven aan een iets sterkere concentratie van lysinen en agglutinenen voor leptospira canicola in het ingespoten serum.

Deze uitkomsten kunnen bepaald als een bevestiging van tabel 11 bij den mensch dienen. In aanmerking genomen dat den mensch relatief kleinere hoeveelheden gegeven worden, komt dit vrij aardig

overeen met de lage titers der 3 personen, die hiervoor werden besproken (tabel 11), vooral in het derde geval, omdat de reactie daags na een serum-injectie werd verricht.

Uit het voorgaande blijkt verder, dat door serum-injecties de diagnostiek, voor zoover deze op de serologische reacties berust, niet op een dwaalspoor wordt geleid, mits men aan de titerstijging, als het voornaamste bewijs eener infectie, de noodige aandacht schenkt. De passieve immunisatie heeft immers na 1 à 1½ week haar invloed op den titer van het serum geheel verloren. Dit is een reden te meer om op herhaling der sero-reactie in alle twijfelachtige gevallen aan te dringen.

Niet in overeenstemming met de boven verkregen uitkomsten zijn de negatieve reacties bij 3 lijders aan de ziekte van Weil, daags na toediening van immuun-serum (dit hoofdstuk, pag. 34). Hier bestond een Weil-infectie en moest men zich afvragen of onder deze omstandigheden de uitwerking van het immuun-serum anders kon zijn. Wellicht worden bij hen de toegevoerde lysinen en agglutinenen, hetzij aan de aanwezige leptospirae gebonden, hetzij op een andere wijze, door het geïnfecteerde organisme onwerkzaam gemaakt.

Om deze mogelijkheid aan een experiment te toetsen, werd bij 2 van te voren geïnfecteerde konijnen anti-serum ingespoten en daarna de titer van het serum der dieren vervolgd.

Konijn 5, wegende 2550 gram, kreeg 24 November 1936 intraveneus 6 ccm. van een dichtgegroeide leptospira-cultuur (stam Deventer); een half uur later werd, eveneens intraveneus, 8½ ccm. anti-Weil-serum (titer 30000) toegediend.

Konijn 6, werd op 1-2-'37 intraveneus geïnfecteerd met 2 ccm. van een voor caviae virulente leptospira-kweek (stam Kok); na twee dagen, toen de sero-reactie nog negatief was, werd dit dier (gewicht 3300 gram) ingespoten met 11 ccm. anti-Weil-serum (titer 100000).

Een ander dier, waarbij de inspuiting van het serum pas 4 dagen na de infectie zou geschieden, bleek voor de proef ongeschikt te zijn, omdat op dit tijdstip de actieve immunisatie reeds aan den gang was en den titer reeds op 300 gebracht had.

Met het begin der actieve immunisatie houdt de mogelijkheid op deze dieren met de voorafgaande 1, 2 en 3 te vergelijken.

Serum-onderzoek op onderstaande tijden na de serum-injectie	Konijn 5.	Konijn 6.
	$\frac{1}{2}$ uur tevoren 6 cc. lept. cult. intraveneus. Sero-reactie met lept. ict. haem.	2 dagen tevoren 2 cc. lept. cult. intraveneus. Sero-reactie met lept. ict. haem.
(Vlak vóór de injectie)	0	0
15 minuten	300	3000
1 uur	300	3000
2 "	300	3000
3 "	300	3000
4 "	300	3000
5 "	300	3000
6 "	300	3000
1 × 24 uur	300	3000
2 × 24 "	300	> 1000
3 × 24 "	300	10000
7 × 24 "	1000	
8 × 24 "	1000	30000
9 × 24 "	1000	
21 × 24 "	> 300	

Bij de twee proefdieren bleef de titer dus vanaf $\frac{1}{4}$ uur tot resp. $3 \times$ en 1×24 uur na de injectie constant; daarna nam de titer toe, resp. op den 7den en 3den dag waargenomen. Deze toeneming moet bij de beide 7 en 5 dagen vroeger geïnfecteerde dieren een uiting der actieve immunisatie zijn. Dit vormt dus een vanzelfsprekend verschil met de na 8 tot 11 dagen negatief geworden sero-reactie bij de konijnen 1 tot 3. Een ander, zij het gering, verschil geeft het verloop in de eerste uren na de infectie; bij no. 5 en 6 ontbreekt n.l. de daling der titers gedurende deze periode. Op den eersten en tweeden dag is echter bij alle 6 proefdieren de titer relatief even hoog (konijn 4 en 6 kregen zeer hoogwaardig immuun-serum).

Deze proeven geven een geheel andere uitkomst dan de drie op bladzijde 34 genoemde Weil-patiënten. Terwijl daar door de voorafgegane injectie van immuun-serum de negatieve reactie niet beïnvloed werd, brengt de serum-injectie bij de konijnen 5 en 6 den titer aanzienlijk omhoog. Het eigenaardige gedrag van het serum der 3 patiënten heeft dus door de proeven geen verklaring kunnen vinden.

HOOFDSTUK VI.

Sero-reacties met formol-cultures.

Hoewel de reactie met levende leptospirae in het routine-bedrijf ons uitstekende diensten bewijst, kan ze nimmer geheel tot haar recht komen in elk willekeurig laboratorium. De zorg steeds goed gegroeide, 4 à 8 dagen oude, leptospira-kweeken in voorraad te hebben en de ervaring, die zoowel voor de uitvoering als voor het aflezen der reacties vereischt is, belemmeren, dat in ieder bacteriologisch laboratorium de reactie, wanneer ze noodig is, kan verricht worden.

Met de bedoeling aan bovenstaande bezwaren tegemoet te komen, werden destijds in ons Instituut proeven verricht, teneinde een meer duurzaam diagnosticum te vervaardigen (diss. Proehoman 1930). Aan goed gegroeide leptospira-cultures werd een geringe hoeveelheid formaline (1 à 2 %) toegevoegd. Zolang de gefixeerde leptospirae in de vloeistof gelijkmatig verspreid bleven, bleek de formol-cultuur bij de sero-reactie goed bruikbaar te zijn. De reacties hebben weliswaar een ander verloop, dan die met levende cultuur (zie later), doch de op beide wijzen verkregen titers benaderen elkaar nagenoeg volkomen.

De duurzaamheid van het diagnosticum liet evenwel in den beginne veel te wenschen over; na eenige dagen, tot 1 à 2 weken, bezinken de leptospirae en klonteren min of meer samen. Aanvankelijk kon door omschudden de gelijkmatige suspensie hersteld worden, na korten tijd laat deze kunstgreep echter in den steek. Toevoeging van 10 % glucose bleek eenige verbetering te geven. Tegenwoordig gebruiken wij weer gewone cultuur, nu slechts met $\frac{1}{2}$ % formaline.

Zuelzer (1936) verklaart de samenklontering en bezinking der leptospirae in formol-cultures als een „zuur-agglutinatie”, omdat onder invloed van licht uit chemisch onzuivere formaline mierenzuur door oxydatie kan worden gevormd. Door nu chemisch zuivere formaline tot 0.1 à 1 % bij de cultures te voegen en deze verder in bruine reageerbuisjes in het donker te bewaren, geeft onderzoekster aan goede resultaten te verkrijgen. In 6 maanden oude, aldus be-

reide formol-cultures kunnen de leptospirae nog gelijkmatig verdeeld zijn.

Ofschoon het fosphaat-buftermengsel in onze voedingsbodems de pH min of meer stabiliseert, hebben wij sindsdien ook chemisch zuivere formaline gebruikt.

Mocht op den duur blijken, dat op deze wijze betere resultaten bereikt worden, dan is er voortaan geen practisch bezwaar meer aan het diagnosticum verbonden.

De sero-reacties met formol-cultures verlopen, zooals hiervoor reeds is opgemerkt, anders dan met levende cultures. Er treedt namelijk alleen agglutinatie op; lysis blijft geheel achterwege, blijkbaar omdat het eiwit door het formaline gefixeerd is. De agglutinenen kunnen dus in de formol-suspensie tot aan de titergrens hun werking ontplooiën, terwijl bij een levende cultuur vanaf een zekere verdunning de leptospirae grootendeels door de lysinen opgelost worden, zoodat de agglutinenen, ofschoon aanwezig, zich niet meer kunnen manifesteren. *) De titergrens, hier door het ophouden der agglutinatie, bij de levende cultuur door het ophouden der lysis gekenmerkt, loopt nauwelijks uiteen.

Sinds 1932 werd van 272 sera van Weil-patiënten de reactie zoowel met levende als met geformaliniseerde cultures van klassieke Weil-stammen verricht.

In tabel 13 worden de verkregen uitkomsten medegedeeld. De tabel moet gelezen als volgt: in de bovenste rij staan 8 sera, die met levende cultuur tot 1 : 10 reageerden; hun reactie met formol-cultuur was bij 4 negatief, bij 1 tot 1 : 10 en bij 3 tot 1 : 30 positief.

Van de 272 sera reageerde bij 152 (of 56 %) de formol-cultuur even hoog als de levende cultuur; deze gevallen staan op de tabel tusschen de diagonale lijnen. Evenwijdig aan deze loop twee stippellijnen, waarvan de eene 74 gevallen (27 %) met één verdunning lager, de andere 22 gevallen (8 %) met één verdunning hoger afgrenst. In totaal heeft de formol-suspensie dus bij ca. 91 % der sera een nagenoeg overeenstemmende reactie.

Buiten deze hoofdgroep staan 24 sera, d.i. 9 %; daarvan gaf slechts één een hoogere, de overige 23 een lagere reactie met het formaline-diagnosticum.

In het algemeen mag men dus aannemen, dat de formaline-reactie neiging heeft iets beneden de waarde van die met de levende cultuur

*) W. Schüffner: Versuch der Vereinfachung der Serodiagnostik bei Weilscher Krankheit (Arch. Schiffs- u. Tropenhyg. 1932, B. 36, S. 239-243).

TABEL 13. Vergelijking der resultaten met levende en met formol-cultures.

Titer met levende cultures	Aantal patienten sera	Titer van dezelfde sera met formol-cultures								
		neg.	1 10	1 30	1 100	1 300	1 1000	1 3000	1 10000	1 30000
(1 : 10)	8	4	1	3						
(1 : 30)	7	1	4	1	1					
(1 : 100)	15	1		5	5	3	1			
(1 : 300)	45	2			8	30	5			
(1 : 1000)	55				1	6	42	6		
(1 : 3000)	66				1	2	21	38	4	
(1 : 10000)	38					1	3	15	19	
(1 : 30000)	38						3	8	11	16

te blijven. Deze neiging schijnt grooter te worden, naarmate de titer stijgt; bij 1 : 1000 staan naast de 42 congruente reacties slechts 7 met een lagere reactie, terwijl bij 1 : 30000 naast de 16 het 22 zijn. Dit kan als een aanwijzing beschouwd worden, dat de aanmaak der agglutininien niet geheel evenredig met die der lysinen behoeft te zijn.

In enkele gevallen gaf het formol-reagens een geheel negatieven uitslag, in tegenstelling met den positieven der levende cultuur. Een moeilijkheid voor de diagnose spruit hieruit echter niet voort, omdat in dit verschil alleen sera betrokken zijn, die niet hooger dan 1 : 300 reageerden. In zulke gevallen stellen wij toch den eisch de reactie te herhalen, om dan bij stijgenden titer ons in positieven, bij gelijk-blijvenden of dalenden titer eventueel in negatieven zin voor de diagnose uit te drukken.

Met zekerheid is uit het bovenstaande materiaal te concluderen, dat de reactie met formol-cultuur op zichzelf voldoende is, elk

Weil-geval serologisch te diagnostiseeren, mits men ook hierbij zoo noodig de reactie herhaalt. Deze betrouwbaarheid en verder het gemakkelijke aflezen der reactie, de ongevaarlijkheid van het reagens en in zeker opzicht ook de eenvoudiger bereiding en grootere duurzaamheid zijn evenveel voordeelen, die het gebruik van het formaline-diagnosticum aanbevelenswaardig maken.

P á e z (Chili) bereidt op bepaalde wijze een formol-antigeen van leptospira-cultures en leest de hiermede ingezette sero-reacties macroscopisch af. De bruikbaarheid van dit antigeen is dubieus, daar hij onder 49 positieve proeven als hoogsten titer 250 vond.

P o t (Utrecht) geeft eveneens een formol-antigeen aan, met behulp waarvan de agglutinatietiter macroscopisch wordt afgelezen. Onder 25 positieve reacties was de hoogste titer ruim 50000. Hoewel de reactie eenvoudig van uitvoering is en scherpe resultaten geeft, is het nadeel, dat de vervaardiging van het antigeen veel moeite en tijd kost. De practijk moet leeren, of deze macroscopische methode, die het donkere veld overbodig maakt, zich kan inburgeren.

Wanneer men de zekerheid had, dat het reagens houdbaar was, dan zou het zaak zijn, het in het groot te laten aanmaken.

HOOFDSTUK VII.

De soortbepaling der leptospira-stammen uit menschen, ratten en honden in Nederland, met behulp van hoogwaardige immuun-sera.

Op de serologische eenheid der Weil-stammen, die in Nederland uit menschen en ratten worden gekweekt, is herhaaldelijk vanuit het Instituut voor Tropische Hygiëne gewezen. Ook de buitenlandsche stammen van leptospira icterohaemorrhagiae (uit Amerika de zgn. gele koorts-stammen van Noguchi, uit Duitschland, Engeland, Frankrijk, Portugal, Denemarken e.a.), die het Instituut ontving, behooren tot dezelfde eenheid.

Deze ziekte-verwekkers toonen daarentegen allen constant duidelijke afwijkingen met b.v. de leptospira hebdomadis, de verschillende leptospirae-stammen uit Nederlandsch-Indië, stam Moskou V (modderkoorts) en met de hiervan geheel gescheiden groep der saprophytische waterleptospirae. Hoogwaardige anti-sera, verkregen door immunisatie van konijnen met klassieke Weil-stammen, geven met deze afwijkende soorten of in het geheel geen reactie (wij zeggen dan dat er tusschen hen en den klassieken stam geen verwantschap bestaat), of er treedt een min of meer sterke reactie op, die wij als mede-agglutinatie aanzien, als uitdrukking van een bestaande verwantschap.

Bij het onderzoek der gekweekte stammen uit menschen, ratten en honden in Nederland werd tot 1931 steeds het klassieke type gevonden. Toen (in 1931) werd in samenwerking met Prof. Klarenbeek een serologisch afwijkende leptospira bij een hond (Roesel Hond Utrecht IV) ontdekt; sindsdien werd deze bij de soortbepaling der stammen geregeld in het onderzoek betrokken.

De hierdoor verkregen resultaten worden in het volgende medegedeeld; achtereenvolgens de stammen uit menschen, ratten en honden.

a. 63 stammen uit menschen werden in den loop van den tijd nauwkeuriger onderzocht en vergeleken. In tabel 14 zijn van 18 dezer stammen de reacties met verschillende sera opgenomen; 12 van de anti-sera werden gewonnen uit konijnen, het serum Croesbeek echter

TABEL 14. Soortbepaling van 18 stammen uit menschen.

[illegible]

was een hoogwaardig patiënten-serum. Hoewel de titer van elk der anti-sera niet altijd even hoog was (deze onderzoekingen gaan over meerdere jaren; soms moest het serum opnieuw bereid worden) komt in deze tabel toch goed uit, dat de klassieke stammen alle hoge reacties geven met de overeenkomstige anti-sera. In ieder geval was de titer minstens 10000.

In de laatste kolom verschijnen de reacties met canicola-anti-serum, waarvan de titer met den eigen stam 30000 bedroeg. Het blijkt, dat dit canicola-serum bij de klassieke stammen (8) constant een lagere reactie opwekte, die tusschen 100 en 3000 lag. Te oordeelen naar het geheel wordt het overtuigend, dat men hier met een verwanten, maar toch afzonderlijk staanden stam te doen heeft.

Het slot van de lijst wordt gevormd door den stam Resoort, uit patiënt no. 216, die door zijn reactie 1:30000 met het canicola-anti-serum en de lagere waarden met de klassieke sera geheel uit het kader der overige menschenstammen valt. Deze serologische overeenstemming met canicola bevestigde de diagnose „canicola-infectie” bij den betreffenden patiënt, wiens sero-reacties reeds gepleit hadden voor deze diagnose.

Nu volgt tabel 15 met een groep van 45 stammen, waarbij met één klassiek en één canicola-serum werd volstaan. Op den laatstgenoemden na, blijken al deze stammen serologisch geheel met leptospira icterohaemorrhagiae overeen te komen. Alleen patiënte no. 327 neemt een aparte plaats in: zij leverde een canicola-stam op. Deze patiënte, Wu., was in het bezit van een geïnfecteerden hond (Flip), waarbij ook een canicola-stam werd geïsoleerd (zie later).

Van deze 63 leptospira-kweeken uit menschen behooren dus 61 tot het klassieke en 2 tot het canicola-type.

b. Uit ratten werden vroeger reeds talrijke stammen gekweekt, die serologisch met leptospira icterohaemorrhagiae overeenkwamen.

Aanvankelijk werd in twee gevallen aan een afwijkenden rattenstam gedacht, (F en K), die serologisch met den Indischen stam Rachmat overeenkwam. In 1934 deelde Prof. Schüffner in een publicatie *) mede, dat in deze gevallen onbekende factoren ons parten hebben gespeeld, en zoo op een dwaalspoor geleid. De met rattennier ingespoten caviae moeten spontaan geïnfecteerd zijn met urine van andere caviae, die tevoren een Rachmat-infectie hadden

*) W. Schüffner: Recent work on leptospirosis (Transact. of the Roy. Soc. of Trop. Med. and Hyg. Vol. 28 No. 1, p. 21).

TABEL 15. Soortbepaling van de overige stammen uit mensen.

STAM	ANTI-SERA		STAM	ANTI-SERA		STAM	ANTI-SERA		STAM	ANTI-SERA	
Nr. patiënt	Groesbeek	Hond Utrecht IV	Nr. patiënt	Wijnberg	Hond Utrecht IV	Nr. patiënt	Kantorowicz	Hond Utrecht IV	Nr. patiënt	Zaan	Hond Utrecht IV
	Titer: > 30000	Titer: > 10000		Titer: > 30000	Titer: 30000		Titer: > 30000	Titer: 30000		Titer: 100000	Titer: 30000
72	10000	< 300	195	30000	300	106	30000	300	306	100000	3000
73	10000	1000	205	10000	300	134	30000	100	316	> 30000	300
76	10000	30	220	30000	100	173	30000	300	319	> 30000	300
95	30000	1000	256	30000	100	184	30000	300	321	30000	300
107	> 30000	1000	290	30000	100	213	30000	300			
112	30000	300	291	30000	1000	218	30000	300			
116	30000	< 300	294	30000	1000	241	30000	300			
171	30000	300	295	> 30000	1000	242	30000	< 300			
180	> 30000	1000	305	100000	> 1000	246	10000	< 30			
182	30000	300				248	< 30000	100			
188	30000	< 300				250	30000	300			
203	30000	1000				259	30000	300			
						265	10000	300			
						270	30000	1000			
						271	> 30000	1000			
						276	> 10000	300			
						285	> 30000	300			
						286	30000	< 100			
						289	30000	300			
									327	3000	30000
									canicola		

doorstaan. Dit geschiedde in een tijd, waar men nog afging op het later foutief gebleken beginsel, dat bij proefdieren geen contact-infecties voorkwamen.

Om na te gaan of het canicola-type ook onder de ratten verspreid is, zijn sinds 1932 alle nieuw-gekweekte ratten-stammen, totaal 104, ook onderzocht met anti-serum verkregen met canicola.

Tabel 16 geeft de reacties van deze stammen. Zij gedragen zich *allen* serologisch als de klassieke verwekkers der ziekte van Weil. Door de klassieke anti-sera worden ze tot de titergrens beïnvloed, met canicola-serum blijven ze er onder. Deze mede agglutinaties varieerde tusschen 1 : 30 en 1 : 3000, de meeste dezer reacties gingen tot 1 : 300 of 1 : 1000.

Geen enkele stam gaf dubieuze uitslagen. Dit uniforme gedrag van al deze stammen tegenover de gebruikte sera is tevens een illustratie van de betrouwbaarheid der lysis-agglutinaties-proef; niettegenstaande de groote verwantschap openbaart de sero-reactie een wezenlijk verschil tusschen de klassieke leptospirae en de canicola, een verschil, dat door epidemiologische feiten nog veel krachtiger gestaafd wordt.

e. In tabel 17 staan de reacties van 20 uit honden geïsoleerde stammen.

Drie dezer stammen waren niet van spontaan-geïnfecteerde honden afkomstig. De honden Fidel, Pluim en Tommie werden in ons laboratorium geïnfecteerd met den stam uit hond Bob (Kleingeld). Uit de opgegeven reacties kan gemakkelijk worden afgeleid tot welke soort elke stam behoort. Van de 17 kweeken uit spontaan-geïnfecteerde honden behooren 11 tot het canicola- en 6 tot het klassieke type. De uitslagen zijn ook hier vrij scherp; alleen de hooge mede-agglutinaties van stam Pluim, tot 1 : 10000 met anti-serum Kantorowicz valt iets buiten het kader. De stammen Bob, Fidel en Tommie, die immers met Pluim gelijk te stellen zijn, geven echter een lagere mede-agglutinatie.

De uitkomst der soortbepaling bij deze 17 stammen uit honden, komt overeen met die der sero-reacties van honden, die een leptospirosis doormaakten. De sera van 92 honden gaven een duidelijk hoogere reactie met canicola en die van 59 honden een hoofd-reactie met leptospira icterohaemorrhagiae. Bij 12 honden wezen de reacties niet uit welke soort de infectie veroorzaakte; mogelijk, dat men hier met dubbelinfecties te doen had, of dat door het ontbreken van een herhaalde bloedzending geen conclusie kon worden getrokken.

TABEL 16. Soortbepaling van 104 rattenstammen.

			ANTI-SERA		
Nummers van de rattenstammen	Zaan	Hond Utrecht IV	Nummers van de rattenstammen	ANTI-SERA	
				Kantoro- wicz	Hond Utrecht IV
	Titer: 100000	Titer: 30000		Titer: 30000	Titer: 30000
135 Amsterdam	> 30000	300	92 Amsterdam	> 30000	300
141 "	300000	1000	94 "	30000	300
156 "	30000	1000	95 "	> 30000	300
158 "	> 30000	1000	106 "	30000	1000
159 "	> 30000	1000	107 "	> 30000	300
160 "	300000	1000	112 "	> 30000	300
162 "	100000	300	114 "	> 30000	> 100
176 "	30000	1000	125 "	> 30000	> 300
177 "	300000	1000	126 "	> 30000	1000
178 "	100000	3000	127 "	> 30000	> 100
182 "	30000	1000	128 "	> 30000	> 300
183 "	100000	1000	131 "	> 30000	1000
186 "	100000	1000	132 "	> 30000	300
207 "	300000	1000	136 "	> 30000	3000
265 "	100000	1000	138 "	30000	1000
266 "	300000	1000	139 "	> 30000	300
271 "	300000	300	97 Jutfaas	30000	300
282 "	30000	1000	103 Utrecht	> 30000	1000
295 "	30000	1000	108 "	> 30000	30
303 "	30000	1000			
304 "	100000	300			
306 "	30000	300			
320 "	100000	> 300			
329 "	100000	300			
336 "	> 30000	300			
338a "	30000	1000			
343 "	> 100000	> 300			
356a "	100000	300			
357 "	300000	300			
363 "	30000	300			
364 "	100000	1000			
366 "	300000	300			
367 "	> 100000	3000			
368a "	100000	300			
370 "	30000	300			
371 "	> 30000	300			
376 "	100000	300			
388 "	100000	300			
145 Haarlem	100000	300			
191 Rotterdam	100000	300			
192 "	100000	1000			
194 "	100000	100			
195 "	100000	300			
197 "	> 30000	300			
198 "	300000	1000			
201 "	300000	1000			
202 "	100000	1000			
217 "	100000	> 1000			
218 "	300000	1000			
219 "	100000	> 1000			
225 "	100000	300			
233 "	100000	300			
250 "	100000	1000			
260 "	100000	300			
264 "	100000	300			

			ANTI-SERA		
Nummers van de rattenstammen	Croes- beek	Hond Utrecht IV		Croes- beek	Hond Utrecht IV
				Titer: 30000	Titer: 10000
I. Instituut Amsterdam	30000	300			
II. Instituut Amsterdam	> 30000	300			
Rat Alkmaar	10000	300			
I. Dordrecht	30000	1000			
Rat Weesper- karspel	10000	1000			

De canicola komt blijkbaar onder honden vaak voor, terwijl ze niet bij ratten gevonden is, een feit van groote beteekenis voor de epidemiologie der canicola en de door haar veroorzaakte ziekte. De rat kan dus gevoegelijk overgeslagen worden als schakel bij de verspreiding der canicola.

Bij een onderzoek van 90 honden-sera in Freiburg vonden Uhlenhuth en Zimmermann 15 tot 20 % positieve reacties, hiervan reageerde $\frac{1}{3}$ het hoogst met de spirochaeta icterogenes (syn. l. icterohaemorrhagiae), de rest met canicola. Deze uitkomst wijst er op, dat het canicola-type ook in Duitschland onder honden voorkomt.

Kortelings ontvingen we van Prof. Klarenbeek een stam, die door Prof. Wirth te Weenen werd geïsoleerd; deze stam blijkt ook tot het canicola-type te behooren, de eerste in het buitenland gekweekt.

TABEL 16 (Vervolg). Soortbepaling van 104 rattenstammen.

Nummers van de rattenstammen	ANTI-SERA		Nummers van de rattenstammen	Patiëntens- serum	Anti- serum
	Verdun	Hond Utrecht IV		Wekking	Hond Utrecht IV
	Titer: 100000	Titer: 30000		Titer: 10000	Titer: 30000
144 Amsterdam	100000	1000	Slachthuis		
163 "	100000	> 1000	Alkmaar	10000	300
277 "	30000	300	23 Amsterdam	10000	> 100
283 "	30000	1000	37 Rotterdam	10000	100
189 Rotterdam	100000	1000	53 "	10000	100
240 "	100000	> 1000	55 "	10000	300
250a "	30000	1000	56 "	10000	100
255 "	100000	300	58 "	10000	100
263 "	30000	300			
264 "	30000	> 300			

Nummers van de rattenstammen	Patiëntens- serum	Anti- serum	Nummers van de rattenstammen	ANTI-SERA	
	Geest	Hond Utrecht IV		Wijnberg	Hond Utrecht IV
	Titer: 30000	Titer: 30000		Titer: 30000	Titer: 30000
43 Rotterdam	10000	100	33 Amsterdam	10000	300
46 "	30000	300	87 "	> 30000	> 300
75 "	30000	> 100	90 "	10000	> 100
			47 Rotterdam	30000	300
			Kralingsche Plas	30000	> 100

TABEL 17. Soortbepaling van stammen uit honden.

A N T I - S E R A										
KLASSIEKE STAMMEN										CANI-COLA
		Moné Titer: 50000	Wijnberg Titer: 10000	Elte Titer: 50000	Koekoek Titer: 25000	Kantorowicz Titer: 30000	Zaan Titer: 100000	Hond Utrecht I Titer: 10000	Pat. serum Groesbeek Titer: 30000	Hond Utrecht IV Titer: 30000
Hond Utrecht I		10000	10000	50000				10000		
" " III				50000				10000		
" Asta									30000	30000
" Herder									10000	30000
" Pam									10000	30000
" Wolf									10000	30000
" Utrecht IV			300		1000	300	1000			30000
" Flip									3000	30000
" Hans									1000	30000
" Joop									3000	30000
" Lux									1000	30000
" Mona									300	30000
" Olaf									1000	30000
" Robby									1000	30000
" Tief									3000	30000
" Flip (Wubbeling)							3000			30000
" Bob (Kleingeld)			300							30000
" Fidel	{					> 1000				30000
" Pluim						10000				30000
" Tommie						3000	3000			30000

HOOFDSTUK VIII.

Serologische vergelijking der klassieke Weil-stammen op grond van de reacties met patiënten-sera.

Uit de systematische bepaling der soort van de geïsoleerde stammen, waarbij hoogwaardige immuun-sera dienst deden, bleek de serologische eenheid der Weilstammen, die wij „klassieken” noemen.

In het volgende worden de reacties besproken van 199 patiënten-sera, waarbij meerdere dezer stammen werden gebruikt, zoodat eveneens vergelijking mogelijk was.

a. 175 dezer sera gaven elk met 2 of meer stammen een gelijk resultaat bij de sero-reactie; hierbij zijn afwijkingen, die slechts één eenheid in de verdunningen betroffen, verwaarloosd. Korthedshalve worden de uitkomsten niet één voor één, doch samengesteld medegedeeld. In t a b e l 18 is te zien, welke stammen voornamelijk werden gebruikt en hoeveel sera telkens met 2 klassieke stammen overeenstemden. De tabel geeft aan weerszijden der diagonaal dezelfde cijfers, deze verdubbeling is gehandhaafd, omdat daardoor het aantal reacties met elken stam beter is te overzien.

Het totaal der vergelijkingen is in de laatste kolom te vinden. Men ziet hieruit, dat vooral de stammen Zaan, Krommenie, Moné en Wijnberg vaak in het onderzoek betrokken zijn; dit was min of meer afhankelijk van de toevallig beschikbare cultures, d.w.z. zulke, die voldoende dicht gegroeid waren om voor de reactie gebruikt te kunnen worden.

Echter ook bij de andere stammen is het cijfer (minstens 9 overeenstemmende uitkomsten) groot genoeg om voor onze opvatting voldoende gewicht in de schaal te leggen.

b. Bij 24 sera gaven enkele klassieke stammen reacties, die meer dan één eenheid uiteenliepen. Tegenover de 175 overeenstemmende beschouwen we deze als uitzonderingen. Ze zijn in t a b e l 19 één voor één opgenomen, voor een meer volledigen indruk.

Als toelichting diene het volgende: De patiënten-sera zijn afkomstig van een bepaalden ziekte-dag, die achter het nummer vermeld is. Werd ons van een patiënt meerdere malen serum aangeboden, dan volgt dit onder vermelding van den betreffenden ziekte-dag.

TABEL 18. Samenvatting van het aantal overeenstemmende sero-reacties, telkens ten opzichte van 2 klassieke Weil-stammen.

De tabel is te lezen als volgt:

19 patienten-sera reageerden met stam Zaan en stam Krommenie even hoog,
 2 " " " " " " " " Rotterdam " "
 enz. enz.

	Zaan	Krommenie	Rotterdam	Zwolle	Franken	Moné	Wijnberg	Elte	Schermerhorn	Kantorowisz	Deventer	Weil-Berlijn	„Gele koorts Ha”	Rat H. T.	TOTAAL
Zaan		19	2	1	2	10	20	13		1	7	6	1	3	85
Krommenie	19		2	2	2	4	7	4					1	5	46
Rotterdam	2	2		1	1	1	1						1		9
Zwolle	1	2	1				1					1	1	3	10
Franken	2	2	1				3						3		11
Moné	10	4	1				20	6	3		3		1	2	50
Wijnberg	20	7	1	1	3	20		3	3	10	6		1	3	78
Elte	13	4				6	3						1	1	28
Schermerhorn						3	3				6				12
Kantorowisz	1						10				2				13
Deventer	7					3	6		6	2					24
Weil-Berlijn	6			1										2	9
„Gele koorts Ha”	1	1	1	1	3	1	1	1						1	11
Rat H. T.	3	5		3		2	3	1				2	1		20

Soms werd de reactie met meer dan 2 stammen verricht, hetwelk niet steeds op denzelfden dag geschiedde. Dit is uit de tabel niet te lezen. Het feit is echter van belang, omdat toegegeven moet worden, dat de titer van het in de ijskast bewaarde serum intusschen kon veranderen. De kans hierop is evenwel niet groot genoeg (naar wij uit ondervinding weten) om de verschillen afdoende te verklaren. Ook op de eventueele fouten bij de uitvoering en het aflezen der reacties moet gewezen worden. Door bij sterke afwijking de reacties over te doen en te laten controleeren door meerdere geschoolde per-

sonen, hebben wij getracht zulke fouten tot een minimum te beperken. Geheel kunnen we ze niet loochenen.

Bij nadere beschouwing van de tabel treft ons bij no's 46, 52 en 178 het verschil tusschen de reacties met „Zaan” en „Wijnberg”. Volgens de voorafgaande tabel hadden deze stammen met 20 andere patiënten-sera een gelijke uitkomst. Hier daarentegen vinden we verschillen van zeer uiteenloopenden aard. Twee keer is „Zaan” hooger, n.l. 2500 tegen 250 en 3000 tegen 300, den anderen keer is „Zaan” lager dan „Wijnberg” 2500 tegen 10000. In dit laatste geval wordt 15 dagen daarna ook bij „Zaan” de 10000 bereikt om echter later weer op 2500 te dalen. Ook tegenover andere stammen, „Rat H.T.” en „Schotte”, is „Zaan” aan den lagen kant.

Een ander beeld geeft het serum 322, waarmede „Zaan” en „Wijnberg” zich wel gelijk gedragen, doch beiden veel minder worden beïnvloed dan „Kantorowicz” en „Weil-Berlijn”. Van een tweede serum, dat 8 dagen later werd ontnomen, is de titer voor beide eerste stammen opgelopen, zoodat er slechts een gering verschil met „Kantorowicz” en „Weil-Berlijn” overblijft. Voor de uiteindelijke verklaring is dit een zeer belangrijk voorbeeld.

De overige gevallen op de tabel hebben geen nadere toelichting noodig.

Wanneer we overgaan tot de verklaring, voor zoover die boven nog niet is gegeven, dan valt allereerst op te merken, dat elke regemaat in de afwijkingen ontbreekt.

Het uiteenloopen der titers kan tot stand komen, tengevolge van kleine verschillen, die in de antigene structuur der stammen bestaan. Sommige patiënten zouden hierop bij de productie van anti-lichamen zoo fijn reageeren, dat men met de reactie het verschil kan waarnemen.

Meestal echter ontbreekt een dergelijke fijne instelling bij de patiënten en zoo verkrijgen we sera van meer uniformen aard. Bij konijnen-sera zagen we minder verschillen; dit kan afhankelijk zijn van den aanleg van de proefdieren, dus evenals bij de meeste patiënten, maar het zou ook het gevolg kunnen zijn van de herhaalde inspuitingen, die ter verkrijging van hoogwaardige sera noodig waren.

Soms zagen we, dat zulke differenties vlak na elkaar voorkwamen. Dit gaf den indruk, alsof de agglutinabiliteit der stammen door den groei beïnvloed werd. Toen Z u e l z e r dan ook meende gevonden te hebben, dat reactie afhankelijk was van den zuurgraad, waarin de stammen gegroeid waren, hebben wij de proeven nagedaan, in de

hoop hierin de oplossing der afwijkende reacties te vinden. Onze uitkomsten konden dit echter niet bevestigen; de pH bleek in de marge, waarmede in de praktijk gerekend moet worden, n.l. van pH 6.5 tot 8.0, niet den minsten invloed op de hoogte van den titer te hebben. Daarmede is natuurlijk niet uitgesloten, dat er andere factoren bestaan, die de agglutinabiliteit tijdelijk kunnen bevorderen of verminderen.

Bij bacteriën heeft men soortgelijke onregelmatigheden in antigene structuur ook waargenomen. In de laatste jaren echter, is het inzicht sterk bevorderd door de receptoren-analyse, na het bekend worden der O- en H-factoren bij enkele soorten. Bij de salmonellosen heeft dit een heele omwenteling in onze opvattingen teweeg gebracht.

Een dergelijk fijn inzicht ontbreekt ons bij de leptospirosen nog ten eenen male. Wij weten dus niet, welke factoren hier nog verscholen zijn. Vandaar dat we voorloopig alleen de feiten kunnen vastleggen, zonder ze verder te kunnen verklaren.

Hoe dit ook zij, voor de soortbepaling der leptospirae is de gelijkmatigheid der konijnen-sera een voordeel geweest. Ze leidde ons tot het denkbeeld der eenheid van de klassieke stammen. Met konijnen-sera wordt dit reeds door enkele reacties duidelijk. Bij gebruik van patiënten-sera kan men den juiste weg alleen door vergelijking van een groot aantal reacties vinden.

Deze opvatting van ons wordt gesteund door de ontdekking der leptospira canicola, die zich ondanks een zekere verwantschap kenmerkte door constante serologische verschillen; dat we hier werkelijk met een andere soort te maken hadden, werd vooral door de bijzondere epidemiologie (niet bij ratten, alleen bij honden voorkomend), en tevens door haar kliniek bevestigd.

De in de literatuur herhaaldelijk uitgesproken meening, dat de serologie voor de determinatie der stammen in den steek laat, wordt hiermede stellig weerlegd. Alleen wanneer men van een gering aantal reacties uitgaat, en vergelijking op groote schaal, die wij als een *conditio sine qua non* beschouwen, achterwege laat, zou men in de verleiding kunnen komen den klassieken stam te splitsen.

Behalve serologische, gebruikt men ook immunologische proeven om de soort der leptospirae te bepalen. Velen stellen de uitkomsten der z.g.n. kruis-immunisatie zelfs geheel op den voorgrond (Uhlenhuth) en inderdaad als de stammen heteroloog zijn en ver van elkander staan, geven deze proeven een zeer duidelijken uitslag. Dieren, die met den eenen stam geïmmuniseerd worden, sterven bij na-infectie met den anderen, althans wanneer deze een voor

caviae pathogene stam is, die zijn volledige smetkracht nog bezit. De uitslag wordt echter minder scherp, wanneer men met verwante stammen te doen heeft. Zoo loopt b.v. de na-infectie met virulente Weil van caviae, die van een canicola-infectie waren genezen, onregelmatig af. Soms blijven de dieren leven, soms gaan ze aan Weil ten gronde. Wil men dus tot een resultaat komen, dan moet men een groot aantal proeven verrichten, waarbij dan uitkomt, dat de door de canicola verleende bescherming, slechts een relatieve was.

De kruis-immunisatie-proeven bij de leptospirosen hebben de moeilijkheid, dat men de doseering niet precies in de hand heeft. Bij beginnende Weil-infectie van den mensch, waarvan men voor het stellen der diagnose caviae met één ccm. bloed inspuit, is de hoeveelheid meestal verrassend klein; immers zelfs bij centrifugatie van het bloed vindt men microscopisch in $\frac{3}{4}$ van de gevallen geen parasieten, terwijl de ziekte bij caviae toch aanslaat.

Omgekeerd is zelfs van een virulente cultuur een groote dosis noodig om van den doodelijken afloop verzekerd te zijn. Het is dus niet mogelijk om van een constante minimale dosis te spreken. En zoo moet men er rekening mee houden, dat men in het eene geval onder de actueele minimale l.d. blijft en een anderen keer ze ver overschrijdt. In dit laatste geval is het zelfs mogelijk, dat van een bescherming tegen denzelfden stam niets blijkt; d.w.z. het dier gaat dood, niettegenstaande een immuniteit aanwezig moest zijn.

Aangezien dus bij de doseering van de leptospirae alle nauwkeurigheid, waaraan bij vele bacterieele infecties wél kan worden voldaan, ontbreekt, kunnen we de kruis-immunisatie niet boven de sero-reactie stellen.

Daarbij komt, dat de virulentie, althans voor caviae een zeer wisselende factor is. Sommige stammen verloren hun virulentie na weinige cultuur-passages, andere behielden ze veel langer, soms jarenlang. De antigene structuur daarentegen bleef onveranderd, voor zoover wij bij tal van leptospira-stammen, tot meerdere soorten behoorend, konden nagaan. Ook nu nog is b.v. de stam „Berlijn” = RGA, de eerste die in Europa geïsoleerd werd (door Uhlenhuth in 1915) identiek met onzen stam „Zaan” uit 1924 en de tegenwoordig in Nederland voorkomende klassieke stammen.

In Europa, waar we, afgezien van den verwekker der modderkoorts, slechts met twee serologisch gescheiden soorten te doen hebben, is het gemakkelijker geweest tot dit inzicht te komen, dan b.v. in Nederlandsch Oost-Indië. Vervoort, Baermann, Zuelzer, Mochtar, Sardjito, Walch, Dinger, Slot e.a. hebben daar

een reeks van stammen gekweekt, die ten deele veel verder van de klassieke afstaan dan de *canicola*. Van deze stammen, worden o.a. de volgende onder de namen Rachmat, Salinem, Pawirosendjojo en Swart in ons Instituut aangehouden. *) Ze zijn door serologische en gedeeltelijk ook door dierproeven duidelijk van elkaar te onderscheiden.

Waar het klinische beeld en ook de epidemiologie in Indië de onderscheiding niet schenen te steunen **), hebben Baermann en Zuelzer van een indeeling geheel afgezien. Dit is begrijpelijk, wanneer men aan de moeilijkheden denkt bij de vaststelling der overeenkomst tusschen de klassieke stammen en de afscheiding van de *canicola* in Nederland. Hier hadden we alleen maar met twee soorten te doen, waarvan de eene zijn zelfstandigheid definitief bewees door het uitsluitend voorkomen bij den hond en den mensch, maar niet bij de rat. Zoover is men in Indië nog niet gekomen; men weet nog niet, of de enkele typen aan bepaalde dieren gebonden zijn, en het blijft dus een bijzonder onderwerp voor de onderzoekers in Indië, in het bijzonder op Sumatra, ook daar te trachten de epidemiologie op te helderen en in de nu nog bestaande chaos op het gebied der leptospirosen orde te brengen.

Geheel onaannemelijk wordt de opvatting van Baermann en Zuelzer, wanneer ze zelfs de waterleptospirae met de pathogene vereenzelvigen, en meenen, dat de antigene structuur der leptospirae niet vast, doch min of meer labiel zou zijn. Zij beweren immers, dat men in het laboratorium overgangen van de eene soort in de andere kan waarnemen, waaruit zou volgen, dat dit ook in de natuur geschiedt. Onze ervaringen, en die van van Thiel, Kirschner en Dinger spreken dit rechtstreeks tegen.

Het standpunt van Baermann en Zuelzer wordt in den laatsten tijd door Schlossberger, Grillo en Scheele overgenomen, althans voor zoover het pathogene stammen betreft. Zij steunen bij dit betoog in de eerste plaats op de uitkomsten der reacties met patiënten-sera, die soms ver uiteenloopen, verder dan wij ooit hebben waargenomen, en komen zoo tot de slotsom, „dass

*) In den laatsten tijd hebben wij de typen Salinem en Rachmat opnieuw uit Medan (Dr. Wolff) en Atjeh (Dr. Kotter) ontvangen, waaruit blijkt, dat ze daar, evenals 14 jaar geleden, voorkomen.

**) Bij nauwkeuriger onderzoek komt dit misschien toch voor den dag; als voorbeeld herinneren wij aan de gevallen van „leptospirosis haemoglobinurica” te Sumatra, waarvan de verwekker nog steeds niet gekweekt is.

sich die Weilsprochaeten nicht in scharf unterscheidbare Typen trennen lassen”.

Een vergelijking, meer dan een zeer oppervlakkige met onze uitkomsten, is niet mogelijk, omdat de schrijvers de hoogte van de verkregen titers niet vermelden; als teekens worden gebruikt —, $\pm$, + zonder verdere omschrijving. Wij willen dan ook hierop niet nader ingaan.

Uitvoeriger zijn de reacties met kunstmatig bereide immuun-sera van het konijn opgegeven, doordat de zooeven aangegeven teekens met nog twee vermeerderd worden, n.l. ++ en +++, wat dan overeen zou komen met onze — (= negatief), 10, 100, 1000, 10000 en meer.

Van de 16 door hen gebruikte stammen zijn er 7 in ons bezit. Wij hebben deze uit de tabel van Schlossberger c.s. gelicht en hebben in tabel 20 van de uitkomsten, door ons en door hen verkregen, een overzichtelijke samenstelling gegeven. Stam „Franken” is een Hollandsche stam, indertijd aan Dr. Zuelzer afgestaan, terwijl met „RGA” de eerste Deutsche door Uhlenhuth en Fromme op caviae overgebrachte stam bedoeld wordt, door ons „RGA Berlijn” genoemd, die ons in 1924 door Prof. Manteufel werd toegezonden. „Wismar” is eveneens een Deutsche stam, die wij aan Prof. Schlossberger te danken hebben.

Om onzen stam „Franken” als een klassieken te doen erkennen, laten wij nog een tweede reeks van anti-sera volgen, die door inspuiting van 5 andere Hollandsche, d.w.z. klassieke stammen werden gewonnen.*)

Een bijzondere toelichting is voor stam „Yaw Yit” nodig, een stam, dien wij indertijd van de Westkust van Sumatra van Slot en van der Walle hebben gekregen. In zijn antigene structuur is stam „Yaw Yit” sterk afwijkend van het klassieke type, de verwantschap hiermede is nog geringer dan de door ons als zelfstandig aangeziene *leptospira canicola*. Aangezien deze stam ook nog nooit in Europa uit een patiënt is gekweekt, moet hij volgens onze meening, als een Indische stam ook streng gescheiden worden gehouden. In de tabel hebben wij hem dan ook een bijzondere plaats gegeven. Ter aanvulling stellen wij naast hem den eersten soortgelijken stam, die in

*) „Gelbfieber” is een stam afkomstig van Amerika, ten onrechte door Noguchi als verwekker van de gele koorts aangezien, in ons laboratorium door Mochtar en Schüffner in 1925 als het klassieke type van Weil herkend.

TABEL 20. Reacties van zeven stammen volgens de tabel van Schlossberger (I) en bij ons (II en III).

A N T I - S E R A								
S T A M M E N	I.	„Gelb- fieber”	RGA	Verdun	Franken	Wismar	Lisboa	Yaw Yit
	„Gelbfieber”	+++		+++		+	—	+++
	RGA	+++	+++	+++	++	+	—	+++
	Verdun	+++	+++	+++	+++		±	+
	Franken	+++	+++		+++	+	+	+++
	Wismar	+		—	++	+++	+++	
	Lisboa	+	±	+++	+	+++	+++	
	Yaw Yit	+++	+++	+++	+++	+		+++

A N T I - S E R A								
II.	„Gele koorts”	Berlijn	Verdun	Franken	Wismar	Lisboa	Yaw Yit	
S T A M M E N	„Gele koorts”	50.000	50.000	> 30.000	50.000	10.000	10000	100
	Berlijn	100.000	50.000	100.000	25.000	3.000	3.000	0
	Verdun			100.000		10.000	> 10.000	300
	Franken	100.000	50.000	30.000	50.000	10.000	> 3.000	> 30
	Wismar			100.000		10.000	10.000	30
	Lisboa			30.000		10 000	10.000	30
	Yaw Yit			0		0	100	100.000

A N T I - S E R A								
van Hollandsche stammen							v. Ind. stammen	
S T A M M E N	III.	Zaan titer: 100.000	Kromme- nie titer: 50.000	Zwolle titer: 50.000	Kantoro- wisch titer: 30.000	Wijnberg titer: 10.000	Yaw Yit titer: 100.000	Rachmat titer: 25.000
	„Gele koorts”	50.000	> 25.000	100.000	> 30.000	10.000	100	250
	Berlijn	100.000	25.000	100.000	10.000	> 3.000	0	500
	Verdun	100.000			30.000	10.000	300	0
	Franken	25.000	25.000	50.000	> 30.000	> 3.000	> 30	250
	Wismar	100.000			30.000	10.000	30	300
	Lisboa	100.000			100.000	10.000	30	300
	Yaw Yit	0			0	0	100.000	10.000
	Rachmat	100	50	0	0	0	100.000	25.000

1923 door B a e r m a n n is gekweekt, en kort daarna aan ons is afge-
staan. Hij staat bij ons als het Rachmat-type te boek.

Overzien wij nu de tabel, en blijven wij voorloopig bij het door
ons zelf bewerkte materiaal, dan moet in de eerste plaats opvallen
de groote regelmaat, waarmede de Hollandsche en de van elders
verkregen stammen overeenstemmen.

De beide Indische stammen, die door hun eigen anti-serum tot
de titergrens worden gelyseerd, vertoonen een lage verwantschaps-
reactie ten opzichte van het klassieke anti-serum, of worden in het
geheel niet beïnvloed. Dat de mede-reactie ten opzichte van den
klassieken stam geheel ontbreekt, werd ook bij de leptospira canicola
waargenomen, dit bleef echter een uitzondering en kwam alleen
voor bij patiënten-sera.

Vandaar, dat wij meenen, dat het Rachmat-type nog verder van
het klassieke afstaat. Wij beschouwen het als een zelfstandig Indisch
type, al weten wij nog niet genoeg over het klinische beeld en al
ontbreekt ook het epidemiologische bewijs, wat voor de zelfstandig-
heid der canicola den doorslag gaf.

De resultaten van Schlossberger leveren een heel ander
beeld. Beschouwen wij het eerst alleen de groep, die volgens ons uit
klassieke stammen bestaat, dan stemmen de vier eerste, die door
een lijn afgezet zijn (Gelbfieber, RGA, Verdun, Franken), onderling
vrijwel overeen. De uitkomsten zijn nagenoeg dezelfde als door ons
gevonden. Terwijl nu de overeenstemming bij onze proeven zich ook
tot de stammen „Wismar”, en „Lisboa” uitstrekt, en over het klas-
sieke karakter van deze twee stammen, de een uit Duitschland, de
ander uit Portugal, nooit eenige twijfel is geweest, wijken deze op
de tabel van Schlossberger sterk af, zoodat men ze voor
heterologe stammen zou kunnen houden.

De anti-sera „Wismar” en „Lisboa” reageeren volkomen negatief
of slechts zeer zwak met de 4 klassieke stammen, omgekeerd blijft
met het anti-serum „Verdun” de stam „Wismar” eveneens negatief.
Tegen alle verwachting in wordt echter de stam „Lisboa” door het
anti-Verdun-serum gelyseerd tot + + +, en gedraagt zich hier dus
weer als een klassieke stam! Dergelijke regellooze reacties hebben wij
nooit waargenomen, en wij aarzelen dan ook zonder meer aan te nemen
„dass ein mit einem bestimmten Weilstamm hergestelltes mono-
valentes Immuns serum zwar einen anderen Weilstamm agglutiniert,
dass aber das mit diesem bereitete Immuns serum umgekehrt kein
derartiges Übergreifen erkennen lässt”, zooals het in het aangehaalde
artikel heet.

Nog meer uit het kader valt het gedrag van stam en anti-serum „Yaw Yit“. Deze Indische stam, waarvan ons de speciale antigene structuur evenals van het oudere type „Rachmat“ bekend is, wordt door het anti-serum van de klassieke typen „Gelbfieber“, „RGA“, Verdun en Franken tot den hoogsten graad van $+$ $+$ $+$ beïnvloed. Alleen de stammen „Verdun“ en „Lisboa“, en het anti-serum „Wismar“ gedragen zich overeenkomstig onze ervaring en zijn negatief of zwak positief. De positie van den stam „Yaw Yit“ wordt door deze afwijkingen, die van volkomen negatief tot volkomen positief gaan, zoo vervaagd, dat hierdoor, evenals door de vooraf besproken verschillen, binnen het kader der klassieke typen een diepe kloof ontstaat tusschen de uitkomsten van de twee Instituten.

Wij zien ervan af*), voor deze disharmonie een verklaring te zoeken, doch wij begrijpen, dat Schlosberger uit de resultaten van zijn tabel tot de conclusie moest komen, dat de antigene structuur der Weil-leptospirae zeer wisselt en het daarom onmogelijk is „typen scherp te onderscheiden“. Op dezen weg verder gaande moest hij, evenals Zuelzer, eischen dat bij het bereiden van immuun-sera voor therapeutische doeleinden het de voorkeur verdient leptospira-stammen van verschillende antigene structuur te kiezen, om op deze wijze een door hem „polyvalent“ genoemd anti-serum te verkrijgen. Wij komen hierop later terug.

Ons standpunt is principieel anders. In het voorafgaande meenen wij het duidelijk genoeg te hebben laten uitkomen, hoe constant het klassieke type in Nederland, beter gezegd in Europa (misschien de geheele wereld) optreedt, en hoe scherp het zich door haar antigene structuur afteekent. Kleine verschillen, die zich bij uitzondering bij de titratie van patiënten-sera voordeden, en die wellicht op de aanwezigheid van onspecifieke groepen moeten worden teruggebracht, hebben aan deze opvatting niets kunnen veranderen (zie blz. 61). Bij bewerking van een groot materiaal, waarbij de sera geheel uitgetitreerd werden, kon zonder moeite steeds weer de juiste richting, hier dan die van het klassieke type, teruggevonden worden. Dank zij deze wijze van werken is het in Nederland mogelijk geworden de

*) Slechts zij aangeduid, dat een verschil kan berusten op de toepassing van de methode der sero-reactie, wat betreft het aflezen, en de wijze van titreeren. Wij bepalen steeds den eindtiter, die zich bij gebruik van versche stammen door het ophouden der lysis, bij formaline-cultuur door het ophouden der agglutinatie documenteert. Hierdoor zouden relatieve verschillen verklaard kunnen worden, doch nooit die gevallen, waar aan de eene zijde 0, aan de andere zijde $+$ $+$ $+$ staat.

leptospira canicola van het klassieke type af te scheiden. Deze afscheiding was niet eenvoudig en heeft lang onderzoek in samenwerking met Prof. Klarenbeek, als dierenarts, noodig gemaakt. Bij de Indische stammen was dit proces eenvoudiger. Uit een ver afgelegen land (Sumatra) stammende, werden ze onmiddellijk met meer critische oogen ontvangen, geanalyseerd en door hun afwijkende serologische eigenschappen terstond als bijzondere typen herkend. Daarna echter zijn ze in het Instituut te Amsterdam als uitheemsch gekenmerkt en door jarenlange vergelijkingen hebben wij ons ervan kunnen overtuigen, dat de zooeven genoemde Indische stam in Nederland bij mensch noch dier in de natuur voorkomt. Alleen leidde het werken met het Rachmat-type tot een toevallige infectie van een assistente *) in ons laboratorium, dit feit mogen wij uit den aard der zaak minder als een uitzondering dan als een bevestiging beschouwen van het boven gezegde, n.l. dat het Rachmat-type evenmin in Europa voorkomt als b.v. de Japansche *leptospira hebdomadis*. Voor Nederland zouden wij hierbij ook de *leptospira grippotyphosa*, de verwekker van de modderkoorts, noemen, die wij nog nooit vonden, waarvan echter een aantal infecties (voor therapeutische doeleinden door Dr. Korthof in Leiden verricht) bestaan.

Na deze uiteenzetting zal men begrijpen, dat wij ons bij het aanmaken van immuun-serum voor de therapie beperken tot de in Nederland (of in Europa) voorkomende stammen, en de Indische, als onnoodig, geheel buiten beschouwing laten.

Wij deelen ten opzichte van het typenvraagstuk het standpunt der Japanners, die eveneens een strenge scheiding doorvoeren, en die naast de klassieke Weil, de Nanukayami en de Akyami als aparte ziekten met een eigen stam stellen.

*) Nu, na ruim 9 jaar, reageert haar serum nog met „Rachmat” tot 1 : 300!

HOOFDSTUK IX.

Immunitet bij de ziekte van Weil.

1. Inleiding.

Het doorstaan van de ziekte van Weil verleent aan het individu een zekere onvatbaarheid tegen een tweede infectie. Bij het dier kan men hiervoor direct het bewijs leveren door de her-enting met een virulenten stam, het dier blijft dan leven. Bij den mensch leidt men de immunitet af uit de anti-stoffen, die in het bloed worden aangetoond. Dit kan nog jaren na de infectie geschieden.

Uhlenhuth toonde bij een man, 22½ jaar na het doorstaan der ziekte, nog beschermende stoffen in het bloed aan: hiervoor maakte hij gebruik van de beschermingsproef bij de cavia. In ons Instituut werd bij een man nog 17 jaar na de infectie een serum-titer van 300 aangetoond.

In dit verband zijn de onderzoekingen van van der Hoeden zeer belangrijk. Bij het onderzoek van de urine van immune menschen en dieren, vond deze onderzoeker, dat door de nieren dagelijks immuun-stoffen worden uitgescheiden. Meestal was de concentratie gering, toch vond hij soms urine-monsters, die al of niet geformaliniseerd in een verdunning van 1 : 2000 een agglutinatie gaven. De hoeveelheden, die dagelijks worden uitgescheiden, zouden den in het lichaam aanwezigen voorraad binnen korten tijd uitputten. Daar dit niet geschiedt en de titer maandenlang hoog kan blijven, mag men hieruit concludeeren, dat de productie van deze anti-stoffen in het lichaam gestadig doorgaat. Of het jarenlang gelijk blijven van den dan meestal sterk gedaalden titer (ongeveer 300) berust op de vorming van een evenwichtstoestand, m.a.w. dat evenveel anti-stoffen aangemaakt worden, als met de urine het lichaam verlaten, of dat de uitscheiding bij een verlaagden titer tenslotte ophoudt, moet nog nader worden nagegaan.

De beschermende werking van het serum bereikt haar hoogsten graad binnen ongeveer twee maanden na het doorstaan der ziekte. Na een zekeren tijd neemt de beschermende werking geleidelijk af, om dan op een bepaald niveau meer constant te blijven. Waar men geen

klinische gevallen van her-infecties kent, mag men zelfs aannemen, dat de immuniteit levenslang duurt.

Tusschen de sterkte der bescherming van het serum en den titer bij de sero-reactie bestaat een zekere parallelliteit. Z i m m e r m a n n deelt mede, dat de titers ten opzichte van beide eigenschappen in alle sera, die hij met dit doel onderzocht, in hooge mate evenredig zijn.

Zonder nu de lysinen en de agglutinenen direct aansprakelijk te willen stellen voor de beschermende werking van de sera, is men dus in de praktijk gerechtigd op de sero-reactie af te gaan, inplaats van op de meer ingewikkelde beschermingsproef, die als ze op behoorlijke schaal geschiedt, rechtstreeks als indicator der verworven immuniteit bij den mensch kan worden beschouwd.

Ook de aangeboren weerstand, dien verschillende diersoorten aan de leptospira icterohaemorrhagiae bieden, voegt men gewoonlijk bij het begrip immuniteit.

Als aangeboren immuun worden in het algemeen de dieren beschouwd, waarbij ziekte-verschijnselen na het inbrengen van bepaalde virulente verwekkers, uitblijven. De factoren, die de natuurlijke verweerkrachten bepalen, zou men in twee groepen kunnen scheiden:

- a. zij, die maken, dat de infectie in het geheel niet aanslaat (het dier is refractair of onvatbaar) en
- b. zij, die na het aanslaan der infectie voeren tot een reactie van het organisme, zonder eigenlijke ziekteverschijnselen (ongevoeligheid voor de ziekte-verwekkers).

Wat de ziekte van Weil betreft, heeft men vroeger gemeend, dat tal van dieren refractair zouden zijn. Later is gebleken, dat dit niet juist is en dat de meeste dieren tot de tweede groep behooren; het zou ons zelfs op het oogenblik moeilijk zijn een volkomen refractair dier te noemen.

Als een voorbeeld van het onder b beschrevene geldt de rioolrat. Een groot gedeelte dezer dieren herbergt de ziekte-verwekkers in de nieren, waar ze gedurende een vroeger doorgemaakte infectie terecht gekomen zijn, om zich daarna in de tubuli contorti te handhaven. De ziekte schijnt als regel bij hen zeer licht te verlopen; bij infectieproeven van jonge onbesmette ratten blijft men veelal in het onzekere, of de dieren ziek worden of niet. De ratten zijn dus zeer vatbaar voor de infectie, doch reageeren matig op de bij hen ingedrongen leptospirae.

Bij konijnen is de toestand weer anders. Jonge konijnen worden

soms na enting met virulente verwekkers duidelijk ziek, zelfs icterus treedt op. Bij oudere konijnen wordt dit zelden waargenomen, in ons Instituut zelfs nooit. Toch worden de volwassen konijnen door inspuiting van een kleine dosis geïnfecteerd en krijgen, zonder dat men ziekteverschijnselen waarneemt, een belangrijken serum-titer.

Ook spontane infecties komen bij deze dieren voor, zooals wij uit ondervinding weten. Een sprekend voorbeeld zagen we korten tijd geleden (November 1936). Bij de sero-reactie van een konijn, dat pas van een handelaar was betrokken, en nog niet voor laboratorium-onderzoek was gebruikt, bleek de titer bij herhaling niet minder dan 30000! Met de urine was de reactie tot 1:20 positief. *Leptospirae* werden ook bij meervoudig onderzoek niet in de urine aangetroffen. Deze zeer hoge serum-titer, die na 3 maanden tot 3000 gedaald was, kan alleen aan een spontane infectie toegeschreven worden, die het dier door direct of indirect contact met leptospira-uitscheiders moet hebben verworven.

Een voorbeeld als dit bewijst de noodzakelijkheid om het serum van konijnen, bestemd voor de een of andere leptospira-proef, van te voren te testen. Hiervoor zijn twee redenen. De eene betreft de bereiding van voedingsbodems met 10 % konijnen-serum: wanneer hiervoor toevallig een beschermend serum gebruikt wordt, is de groei van de leptospirae uitgesloten. Zelfs de overgeënte leptospirae gaan in het buisje te gronde en lossen op, evenals het in onze sero-reactie in het klein geschiedt. Men kan in het laboratorium heele catastrophen beleven, omdat overentingen van cultures, die men in goed vertrouwen op de deugdelijkheid van den voedingsbodem verricht heeft, alle ineens verloren gaan. Sinds 1929, toen wij begonnen den bovenstaanden regel te volgen, hebben wij bij het aanhouden der cultures hier niet meer van te lijden gehad.

De andere reden is misschien nog belangrijker en werpt een licht op mogelijke vergissingen. Dit betreft het bereiden van immuun-serum tegen een bepaalden stam. Stel het geval, dat een toevallig met een klassieken stam geïnfecteerd en hersteld konijn ingespoten wordt met een Indischen stam, dan zou het gewonnen anti-serum tegen beide stammen reageeren en dus misleidende uitkomsten voor de sero-reactie opleveren. Bij de verklaring van onbegrijpelijke verschillen zou men deze mogelijkheid in het oog moeten houden.

Paarden, die aanvankelijk ook als onvatbaar voor de ziekte werden beschouwd, kunnen eveneens geïnfecteerd worden. Bij veulens heeft men zelfs een dodelijke infectie kunnen verwekken.

(Nieschulz en Sardeman). Ook peroraal kan de infectie blijkens het experiment tot stand komen, hetgeen verklaart, dat ook in de natuur paarden met de voeding geïnfecteerd kunnen worden. Herhaaldelijk heeft Sardeman in ons laboratorium paarden-sera aangetroffen met een titer van 300 à 3000.

Wij komen nu tot ons eigenlijke onderwerp, de kunstmatig opgewekte immuniteit.

In tegenstelling met de passieve immuniteit, die in Hoofdstuk V is behandeld, wordt door actieve immunisatie, die een natuurlijke infectie nabootst, een veel langduriger toestand geschapen.

Met levende virulente leptospirae kan men alleen veilig proefdieren immuniseeren, die weinig gevoelig voor Weil zijn. Bijzonder leent zich hiervoor het konijn, dat zelfs sterk virulente stammen verdraagt.

Paarden moet men voorzichtiger behandelen, door ze de eerste malen met avirulente levende stammen in te spuiten. Hierdoor wordt het risico één der kostbare dieren te verliezen tot een minimum teruggebracht. Daarna kunnen injecties van virulent materiaal volgen, om den titer zoo hoog mogelijk op te voeren.

Bij de voor Weil zeer gevoelige cavia heeft uit den aard der zaak alleen vaccinatie met avirulent of dood vaccin kans op succes. Zooals we op pag. 62 reeds opgemerkt hebben, wordt de verworven immuniteit van deze dieren bij na-enting met een groote dosis virulente leptospirae wel eens doorbroken. Wellicht houdt dit verband met de betrekkelijk lage titers, die men bij deze dieren na het herstel van een Weil-infectie meestal aantreft.

De vaccinatie van menschen tegen de ziekte van Weil is tot dusverre alleen in Japan op groote schaal doorgevoerd. Van 1919 tot 1921 entte Wani in de mijnen, waar veel Weil-infecties voorkwamen ruim 10000 mijnwerkers. Als vaccin gebruikte hij cultures van leptospira icterohaemorrhagiae, die op twee achtereenvolgende dagen $\frac{1}{2}$ uur op 56° C. waren verwarmd en hierop na toevoegen van 0.5 % carbol een week in de ijskast werden bewaard. Met dit vaccin kon hij caviae immuniseeren; bij enkele proef-vaccinaties konden ook beschermende stoffen in de sera der betreffende personen worden aangetoond.

De doseering bij menschen hierbij was 2 en 3 ccm. (onderhuidsch) met één week tusschentijd.

Wani deelt mede, dat één jaar na het begin der vaccinatie in 2 maanden tijds onder 3655 gevaccineerden 5 Weil-infecties (0.14 %)

voorkwamen. In ditzelfde tijdvak leverde dezelfde mijn bij 6264 onge-vaccineerden, die als controle dienden, 70 zieken of 1.12 %, dus 8 maal zooveel.

Over den duur der bescherming brengt M a j i m a een aanvulling. In dezelfde mijn (Mitsui-Tagawa) is de enting ook na W a n i 's onder-zoek voortgezet, totdat bijna allen waren behandeld. Van 1919 tot 1926 waren er onder de niet-geënte arbeiders (de minderheid) 673 Weil-infecties, waaronder 98 sterfgevallen; bij de gevaccineerden zag hij slechts 21 infecties, waarvan 2 doodelijk verliepen. Terwijl er in 1919 in totaal 244 gevallen voorkwamen, was dit in 1925 tot 19 teruggelopen.

U h l e n h u t h en Z i m m e r m a n n vaccineerden in 1934, naar aanleiding van een laboratorium-infectie, drie personen in hun insti-tuut met leptospira-vaccin, dat uit den klassieken stam „Franken“ volgens Wani's methode was bereid. Het vaccin werd onderhuids ingespoten, en wel 1 en 3 ccm. met één week tusschentijd. Alle drie kregen slechts een geringen serum-titer, n.l. 14 dagen na de laatste injectie was bij twee de reactie tot 1 : 100 positief en bij de derde tot 1 : 50. De onderzoekers denken aan de mogelijkheid dat de ge-ringe stijging aan de avirulentie van den gebruikten stam te wijten is.

Onder den indruk van dezen relatief lagen graad van immuniteit is door ons ook de mogelijkheid overwogen, om den mensch met avirulente Weil-stammen in te spuiten. Wij bezitten in ons labora-torium tal van stammen van ratten of van patiënten gekweekt, die vroeger sterk virulent waren, doch die nu bij de anders zoo ge-voelige caviae kunnen worden ingespoten zonder ziekte-verschijn-selen, laat staan den dood te veroorzaken. Ook door herhaalde overenting was de smetkracht dezer stammen niet meer op te voeren. Zou het mogelijk en geoorloofd zijn deze levende lepto-spirae bij den mensch ter immunisatie te gebruiken?

Voor een soortgelijk vraagstuk was O t t e n geplaatst toen hij met zijn eersten avirulent geworden pest-stam werkte. Hij is er toen toe overgegaan om zichzelf en zijn medewerkers in te enten, om zoo als proef-personen te dienen.

Wij stonden op het punt hetzelfde te doen, toen onze experi-menten met konijnen, die met gedood virus behandeld, uitkomsten gaven, die ook voor den mensch veel succes belooften.

In het volgende worden onze eigen resultaten van de immunisatie bij het konijn en het paard met levende cultures besproken en daarna de bereiding en de toepassing van dood vaccin.

2. *Immuun-sera, gewonnen uit konijn en paard.*

a. Konijn.

De immunisatie van konijnen geschiedt bij ons ter verkrijging van hoogwaardige, tegen bepaalde stammen gerichte sera, die bij de soortbepaling der nieuw-gekweekte stammen dienst doen.

Van levende, dicht gegroeide cultures, al of niet virulent, worden b.v. achtereenvolgens 1, 1, 1½, 2, 3, 4, 5 en 6 ccm. intraveneus bij de dieren ingespoten, met telkens 2 of 3 dagen tusschenruimte.

Zoodra de titer van het serum tegen den betreffenden stam 30000 of meer is, nemen wij het dier door hartpunctie in narcose zooveel mogelijk bloed af. Soms kan dit reeds na 5, soms eerst na 8 of meer injecties gebeuren.

Door grootere hoeveelheden toe te dienen, b.v. 2, 4 en 6 ccm. met 4 à 6 dagen er tusschen, loopen de konijnen blijkens onze ervaring ook bij gebruik van virulente stammen geen gevaar; op deze wijze krijgt men reeds in ongeveer 2 weken een hoogwaardig immuun-serum.

Hoogst zelden sterft een dier kort na de injectie met verschijnselen van shock.

In den loop der jaren zijn bij ons uit 68 konijnen immuun-sera gewonnen:

28 tegen klassieke Weil-stammen.

5 tegen canicola.

28 tegen andere pathogene leptospira-soorten.

7 tegen waterleptospirae.

De sera worden steriel afgenomen en in de ijskast bewaard. Ze blijven soms jarenlang op den gelijken titer.

b. Paard.

Nadat in ons Instituut vroeger reeds door S a r d e m a n bij twee paarden het verloop der immuniteit was bestudeerd, werd aan ons Instituut door samenwerking met den Directeur van de Rijksseruminrichting te Rotterdam, opnieuw gelegenheid gegeven een paard te behandelen, en wel volgens de ondervindingen, die we intusschen hadden opgedaan. De noodige cultures en aanwijzingen werden door ons verstrekt.

Het dier kreeg intraveneus gelijktijdig cultures van leptospira icterohaemorrhagiae en van canicola; het te maken tweewaardige serum moest voor therapeutische doeleinden dienen.

In t a b e l 21 is de wijze en het verloop der immunisatie overzichtelijk opgegeven.

TABEL 21. Immunisatie van het paard.

Datum	Ingespoten cultures van Weilstammen		Titer met lept. ict. haem.	Ingespoten cultures van Canicola		Titer met Canicola	Opmerkingen
	avirulent	virulent		avirulent	virulent		
20/11/35			0			0	
20/11/35	3 ccm.			3 ccm.			1e injectie.
27/11/35			300			300	
27/11/35	4 "			4 "			2e injectie, enkele uren 39° C.
5/12/35			> 300			> 1000	
5/12/35		1 ccm.		4 "			3e injectie, er na 1 × 39.3° C.
12/12/35			3000			> 30000	
12/12/35		3 "			3 ccm.		4e injectie.
15/1/36			> 3000			> 30000	In twee maanden niet ingespoten wegens ziekte. (Zie tekst.)
12/2/36			3000			3000	
12/2/36		1 "			1 "		5e injectie.
20/2/36			3000			3000	
20/2/36		3 "			3 "		6e injectie.
27/2/36			> 10000			10000	
27/2/36		20 "			20 "		7e injectie.
7/3/36			> 30000			> 30000	
7/3/36		40 "			40 "		8e injectie. (gevolgd door aan- val van dyspnoe)
11/3/36			100000			100000	
11/3/36		40 "			40 "		9e injectie (dyspnoe).
18/3/36			30000			30000	
18/3/36		20 "			20 "		10e injectie (dyspnoe).
30/3/36			> 100000			100000	serum afgenomen.
8/4/36			> 100000			30000	
23/4/36			30000			30000	
6/5/36			10000			10000	
13/5/36			> 10000			> 10000	
20/5/36			10000			10000	
3/9/36			10000			10000	
17/12/36			3000			3000	

De eerste 2, resp. 3 keer werden avirulente stammen gebruikt, eerst daarna volgden virulente stammen in voorzichtig stijgende doses.

Na de 2de en 3de injectie trad een lichte temperatuursverhoging op, n.l. tot 39.3° C., die den volgenden dag weer tot 38.8° C. gedaald was, hetgeen voor een paard normaal genoemd kan worden.

De inspuitingen werden na de 4de injectie, toen de titer voor klassieke stammen en canicola resp. 3000 en 30000 was, wegens ziekte van het paard 2 maanden gestaakt. De temperatuur steeg tot 40° C. en bleef enkele weken op deze hoogte; de eetlust was verminderd, de ademhaling snel en oppervlakkig; icterus trad niet op. Op het oog leek de ziekte het meest op pneumonie; het physische onderzoek bleef echter steeds negatief. Een maand na het begin der ziekte was de temperatuur nog steeds aan den hoogen kant, ongeveer 39.2° C. De bloedstolling bleek toen niet normaal te zijn; de overige ziekte-verschijnselen waren echter weer verdwenen. Eerst 2 maanden na het begin waren alle symptomen verdwenen; hierop werd besloten de inspuiting voort te zetten. De titer was intusschen voor beide soorten leptospirae tot 3000 gedaald. Misschien een aanwijzing, dat de ziekte niets met een leptospira-proces te doen had. Na de 5de, 6de en 7de inspuiting, waarop het paard niet met ziekte-verschijnselen reageerde, steeg de titer tot ruim 30000 voor beide soorten. De laatste, 7de maal, werd een groote dosis gegeven, tezamen 40 ccm. cultuur. Na de 8ste toediening van 80 ccm. cultuur, kreeg het dier een voorbijgaanden aanval van dyspnoe. De verklaring is wel een verkregen overgevoeligheid voor het konijnen-serum, dat immers 10 % van de cultuur-vloeistof uitmaakt. Ondanks de toediening van 1 ccm. cultuur meerdere uren vóór de 9de injectie, teneinde een désensibilisatie te bewerken, ontstond nu nogmaals een zelfde kortdurende aanval, die zich, hoewel in mindere mate, ook bij de 10de en laatste injectie op 19 Maart 1936 herhaalde. Op het einde dezer maand reageerde het serum tot 1 : 100000 met beide leptospira-soorten, toen volgde aftapping van een flinke hoeveelheid bloed.

De reacties na de laatste drie inspuitingen met groote doses mogen we als anaphylactische beschouwen, veroorzaakt door het konijnen-serum. Door een volgenden keer de leptospirae te cultiveeren in voedingsbodems, waaraan serum is toegevoegd, hopen wij dergelijke reacties te voorkomen en zoo mogelijk den titer van het serum nog hoger op te voeren.

De immunisatie van het paard heeft door de ziekte vanaf den 12den December een vertraging ondergaan. Maar ook door vlugger

te stijgen bij de doseering van de cultuur, gelooven wij de voorbereidende behandeling te kunnen afkorten.

Bij konijnen althans kan, zooals boven reeds vermeld werd, met 3 injecties om de 5 dagen een hooge titer bereikt worden.

3. *Proefnemingen over de bereiding van dood vaccin door verwarming van leptospira-kweeken.*

In den loop der tijden en nadat men geleerd heeft de leptospirae te cultiveeren, zijn verschillende methoden toegepast om een bruikbaar vaccin te bereiden door:

a. carbol toe te voegen. Dit geschiedde door I d o, H o k i, I t o en W a n i, die aan hun cultuur het gewone percentage van 0.5 carbol toevoegden. Na één week bewaren in de ijskast werd de heldere vloeistof bij de te immuniseeren personen ingespoten. N o g u c h i gaf dezelfde toevoeging aan zijn cultures, echter daarna werden deze gecentrifugeerd, de doode leptospirae uitgeslingerd en het verkregen sediment als vaccin gebruikt. Op zichzelf lijkt deze methode rationeeler.

Den graad der opgewekte immuniteit in bereikten titer volgens de sero-reactie gaven bovengenoemde onderzoekers niet op.

b. dooden van de leptospirae door het doen uitdrogen van de vloeistof, waarin de ziekte-verwekkers zich bevinden. Volgens U h l e n h u t h kon hiermede bij caviae geen immuniteit opgewekt worden.

c. oligodynamische werking. Hiervan maakte B e g e r (1922) gebruik door een stukje uitgegloeid koper aan de cultures toe te voegen, de leptospirae sterven spoedig. Met zulke „gekupferte” cultures kon hij caviae beschermen tegen een infectie met sterk virulente leptospirae.

d. verwarming. Deze methode, die reeds vroeger door W a n i werd toegepast, hebben wij nader vervolgd.

Waar het er bij ons op aankwam, precies te weten hoe hoog en hoe lang de verhitting moest geschieden, om de leptospirae te dooden, werden oriënteerende proeven verricht. Vroegere onderzoekers, U h l e n h u t h, F r o m m e, H a e n d e l c.s. en Japansche onderzoekers, geven op, dat het sterven bij 50 à 55 ° C. binnen een half uur plaats vindt.

Wij begonnen met een temperatuur van 50° C. Hiervoor werden in 7 steriele buisjes telkens 1 cm. van een dicht gegroeide cultuur van den virulenten stam „Eiswelder” gebracht; deze buisjes werden rechtop tot aan den wattenprop geplaatst in water met een constante

temperatuur van 50° C. In een contrôle-buisje (I) met 1ccm. sterielen voedingsbodem werd de temperatuur gemeten en aldus nagegaan, hoe lang het duurde voor de temperatuur op 50° C. was gekomen. Dit bleek na 3 minuten het geval te zijn; wij mochten aannemen, dat dezelfde tijd ook voor de andere buisjes noodig was om de 50° C. te behalen. Hierop werden de buisjes, genoemd a, b, c, d, e, f en g, na resp. 3 (buisje a), 5 (b), 10 (c), 15 (d), 20 (e), 25 (f) en 30 (g) minuten uit het waterbad genomen. Zoodra ze aan de lucht afgekoeld waren, werd de inhoud microscopisch onderzocht op de bewegelijkheid der leptospirae, hetzelfde gebeurde ook 2 uur later. Voorts werd uit 4 der buisjes geënt, telkens op 2 voedingsbodems en op 1 cavia met $\frac{1}{2}$ cem. intraperitoneaal.

Met contrôle II wordt bedoeld de onverwarmede cultuur, die eveneens microscopisch en in een cavia-proef werd onderzocht. Het verloop van de proef is in de volgende tabel opgenomen.

Inhoud van buisje	Tijdsduur op 50° C.	Microscopisch onderzoek op bewegelijkheid		Op voedingsbodem geënt	Cavia-proef	Bij na-enting in leven
		Direct na afkoeling	Twee uur na afkoeling			
a	3 min.	vrijwel alle leptospirae	vrijwel alle leptospirae			
b	5 „	vrijwel alle leptospirae	vrijwel alle leptospirae			
c	10 „	ongeveer de helft	1 op 5 à 10	positief (2×)	C. 2790 negatief	
d	15 „	1 op 4	minder dan 1 op 10	negatief (2×)	C. 2791 negatief	overleden
e	20 „	een enkele	zeer weinig	negatief (2×)	C. 2792 negatief	overleden
f	25 „	geen	geen			
g	30 „	geen	geen	negatief (2×)	C. 2793 negatief	
Con- trôle II	niet ver- warmd	vrijwel alle leptospirae			C. 2794 positief	

Zoowel de geënte voedingsbodems als de caviae werden 3 weken gecontroleerd; bij de negatief gebleven caviae werden in de beide eerste weken geen leptospirae in het peritoneaal-vocht en het bloed, en gedurende de 3de week evenmin in de urine gezien, d.w.z. een infectie werd niet aangetoond.

Het resultaat is in het kort, dat na 25 minuten verwarmen alle

leptospirae onbewegeijk waren. Op den voedingsbodem is reeds na 15 minuten verwarming de groei uitgebleven, terwijl reeds na 10 minuten de infectie bij de cavia niet meer aansloeg. Wij hebben met korter verwarmde cultuur geen caviae geënt, daar het voornoemde resultaat niet door ons werd verwacht. Het is dus niet uitgesloten dat reeds kortere verhitting op 50° C. dan 10 minuten de leptospirae zoo beschadigt, dat de infectie niet meer aanslaat.

Van de 4 proef-caviae stierven er later twee (C. 2790 en 2793) aan een onbekende oorzaak; sectie, microscopisch en bacteriologisch onderzoek leverden niets op. De andere twee C. 2791 en C. 2792 werden 33 dagen later intraperitoneaal ingespoten met $\frac{1}{4}$ ccm. van denzelfden virulenten stam „Eiswelder”, als contrôle diende C. 2825, die binnen 7 dagen succombeerde met vele leptospirae in bloed en lever, met icterus en longbloedingen. De beide proefdieren reageerden niet op de enting, het peritoneaal-vocht en het bloed bleven negatief.

In deze proef, waarin de uitwerking van de verwarming op 50° C. voor een bepaalden stam werd nagegaan, zagen we, dat de leptospirae na minstens 25 minuten verwarming ten gronde waren gegaan, voorzooover we dit konden controleeren.

De proef heeft ons verder geleerd, dat de verwarming op 50° C. binnen 10 minuten aan de leptospirae een gevoeligen slag toebrengt, zoodat ze een cavia niet meer kunnen infecteeren. Voor het aanslaan op den voedingsbodem lag de grens iets hooger, n.l. tussehen 10 en 15 minuten, terwijl bij microscopisch onderzoek kort na afloop der verwarming, die gedurende 20 minuten plaats vond, nog enkele exemplaren bewogen.

Bij herhaling van de proef kregen we minder regelmatige uitkomsten. De verklaring hiervoor meenen we in een foutieve wijze van verwarming gevonden te hebben. Sinds wij de buisjes dichtsmelten en dan in het waterbad geheel onderdompelen, zijn de uitkomsten constant.

B. Om wat uitvoeriger na te gaan, of verwarming op 50° C. gedurende een half uur ook andere leptospira-stammen vernietigt, werden de volgende 5 stammen aldus behandeld, nu in dichtgesmolten en ondergedompelde buisjes:

„Eiswelder”: virulente klassieke Weil-stam.

„Koning”: virulente klassieke Weil-stam.

„Zaan”: avirulente klassieke Weil-stam.

„Resoort”: virulente canicola-stam.

„Wa Z”: stam van water-leptospirae.

Zoodra de buisjes waren afgekoeld, werd de inhoud microscopisch onderzocht: geen enkel bewegende leptospira werd hierbij gezien; van belang is, dat dit ook niet bij de saprophytische stam „Wa Z” werd waargenomen. Vervolgens werden uit elk buisje 2 steriele voedingsbodems geënt. De 10 aldus verkregen buisjes werden na 1, 2 en 3 weken onderzocht op de aanwezigheid van levende leptospirae, steeds met negatief resultaat.

Slechts volledigheidshalve vermelden we nog de voortzetting van deze proef; dezelfde stammen werden ook verwarmd op:

50° C. gedurende 1 uur,

56° C. gedurende $\frac{1}{2}$ uur,

56° C. gedurende 1 uur.

Het spreekt na het voorafgaande vanzelf, dat in de geënte voedingsbodems geen groei ontstond.

De uitkomsten zijn geheel in overeenstemming met de opgaven van andere onderzoekers, de leptospirae gaan reeds bij betrekkelijk lage temperatuur ten gronde. Gaat men uit van de veronderstelling, dat het antigene vermogen minder door deze lage dan door hogere temperaturen wordt aangetast, dan zou de verhitting op 50° C. gedurende een half uur de grens zijn, waarbij men veilig een dood vaccin van leptospirae kan verkrijgen.

4. *Virulente leptospirae na 10 minuten verwarming op 50° C. bij caviae ingespoten.*

Hiervoor zagen we, dat een 10 minuten op 50° C. verwarmde virulente leptospira-cultuur (stam „Eiswelder”) bij een cavia geen infectie teweeg bracht, hoewel er nog vele levende leptospirae blijkens het microscopische onderzoek aanwezig waren en ook de enting op 2 verse voedingsbodems positieve resultaten had.

Om het toeval, dat hier een rol kan gespeeld hebben, uit te sluiten is dezelfde proef nog twee maal verricht, en wel met de virulente stammen „Koning” en „Kok”; resp. 2 en 3 caviae werden met $\frac{1}{2}$ à 1 cc. van de kort verwarmde culturen ingespoten. Het verloop dezer cavia-proeven, met inbegrip van de Eiswelder-proef, volgt op blz. 82.

De proef met deze 5 nieuwe caviae is dus een bevestiging der voorafgegane eerste proef. Bij geen der dieren ontwikkelde zich een infectie. Evenmin vertoonde het serum van drie hunner resp. 35, 13 en 13 dagen later een positieve agglutinatie-proef, die men na een infectie, zij het een stomme, had kunnen verwachten.

Caviae	Intra-perit. geënt met 10 min. op 50° C. verwarmede virulente leptospira-cultuur	Onderzoek op leptospirae na de enting in peritoneaal- vocht, bloed en urine	Contrôle op virulentie der onverwarmede cultuur	
			Intra-perit. geënt met $\frac{1}{2}$ ccm. cultuur	
2790	„Eiswelder” $\frac{1}{2}$ ccm.	negatief	C. 2794 positief, overleden typisch op 7den dag	
2948	„Koning” 1 „	negatief	C. 2946 positief, overleden typisch op 7den dag	
2948a	„ $\frac{1}{2}$ „	negatief		
3052	„Kok” $\frac{1}{2}$ „	negatief	C. 3051 positief, overleden typisch op 7den dag	
3053	„ $\frac{1}{2}$ „	negatief		
3054	„ $\frac{1}{2}$ „	negatief		

Wat de bewegelijkheid betreft, was de invloed der verwarming ook bij deze stammen gering. De meeste leptospirae bewogen nog.

Evenals „Eiswelder” werden ook de verwarmede cultures van „Koning” en „Kok” elk op 2 voedingsbodems geënt. Deze groeiden binnen twee weken tot dichte cultures uit.

We vinden hier een zekere tegenstrijdigheid: de op 10 minuten verwarmede leptospirae sloegen bij geen der 6 dieren aan, maar ontwikkelden zich op den gewonen voedingsbodem, zij het in een vertraagd tempo, tot dichte cultures. Er moet dus door de verwarming iets aan de kweek ontnomen zijn. De verklaring, die we hiervoor willen geven, kan tweeledig zijn:

primo is het mogelijk, dat de verwarming bij alle leptospirae de elementen, waaraan het infecteerend vermogen verbonden is, beschadigt of vernietigt, terwijl het groeivermogen in de cultuur min of meer behouden blijft; volgens van Loghem's terminologie zou men van een adaptaat kunnen spreken;

secundo kan de resistentie der leptospirae individueel verschillend zijn, zoodat slechts enkele zeer resistente den dans ontspringen. Hiervoor pleit in zeker opzicht het feit, dat bij langere verwarming het aantal levenden steeds minder wordt. Omgekeerd behoeft de bewegelijkheid, die na 10 minuten nog zoo weinig gestoord is, dit niet tegen te spreken. Het zouden grootendeels reeds beschadigten kunnen zijn, waarvan slechts een klein gedeelte herstelt. Op versche voedingsbodem gebracht zijn ze in staat weer tot cultuur uit te groeien. In het dierlijk lichaam echter, dat tenslotte steeds eenige

natuurlijke verweerkraft (b.v. phagocytose) bezit, zijn deze enkelen niet in staat zich te handhaven.

De invloed van de verwarming kenmerkte zich bij verdere proeven als een zeer voorbijgaande. Entingen van caviae met de 2de cultuur-passage van „Eiswelder”, de 2de van „Koning” en de 4de van „Kok” veroorzaakten typische „Weil-infecties” met doodelijken afloop.

De smetkracht van leptospirae, in den zin dan als hierboven is behandeld, kan door kortdurende verwarming verdwijnen, komt echter bij verder kweken onmiddellijk weer terug.

5. Vaccinatie van konijnen en menschen met dood vaccin.

a. *Konijnen.* Zooals we uit onze vele konijnen-proeven weten, reageeren deze dieren op een injectie van leptospira-cultuur met een vrij snelle en ruime productie van lysinen en agglutinininen. Nu ging het er om na te gaan, wat men met dood vaccin kon bereiken. Er werden zes dieren geënt, elk ontving intraveneus van een bepaald vaccin 2, 4 en 6 ccm., met tusschenpoozen van 4 of 5 dagen.

Konijn	Stam, gebruikt voor het maken van vaccin	Bereiding van het vaccin
384	Canicola-stam Resoort	$\frac{1}{2}$ uur verwarmd op 50° C.
390	Klassieke stam Eiswelder	1 „ „ „ 56° C.
391	„ „ „	} $2 \times \frac{1}{2}$ uur verwarmd op 56° C. met 24 uur tusschentijd, carbol tot 0.5%; daarna 1 week in ijskast.
393	„ „ Moné	
394	„ „ „	1 uur verwarmd op 100° C.
401	„ „ „	1 „ „ „ 100° C.

Behalve het eerste dier, waarbij een canicola-vaccin gebruikt werd, kregen ze allen vaccin bereid uit klassieke Weil-stammen. Voor de konijnen 391 en 393 diende een vaccin, dat volgens de methode van W a n i bereid was, terwijl 394 en 401 behandeld waren met cultures, die gedurende 1 uur op 100° C. (!) verhit waren. Vlak voor iedere injectie, en op verschillende tijden na de laatste, werd van ieder konijn wat bloed afgenomen ter bepaling van den serum-titer.

T a b e l 22 geeft het verloop dezer konijnen-proeven; als contrôle op de bij hen verkregen titers zijn twee konijnen toegevoegd, waarbij de vaccinatie met levende leptospirae geschiedde. Bij twee dieren, no. 391 en 394, moest met twee injecties worden volstaan; bij het eerste dier verongelukte het te gebruiken vaccin (bereiding volgens

TABEL 22. Intraveneuze vaccinaties

Konijn no.	384	390	391	393
Vaccin.	Cult. Resoort (canicola) 1 uur bij 50° C.	Cult. Eiwelder 1 uur bij 56° C.	Cult. Eiwelder 2 x ½ uur op 56° C. - 0.5% carbol	Cult. Moné 2 x ½ uur op 56° C. + 0.5% carbol
	Reactie	Reactie	Reactie	Reactie
	ccm. met klass. stam met canicola	ccm. met klass. stam met canicola	ccm. met klass. stam met canicola	ccm. met klass. stam met canicola
dag: 1	0 0	0 0	0 0	0
1	2	2	2	2
6	0 0	100 30	> 100 > 30	100
6	4	4	4	4
7				
7				
10	100 30000	> 1000 300		
10	6	6		
11			> 3000 1000	> 3000 > 3000
11				6
13		1000 300		
14	300 > 30000		3000 1000	
14				
15		> 3000 > 1000		
16				
18				10000 3000
19		10000 1000		
20				
22		10000 1000	> 1000 300	
25				
29				
30		3000 > 300		
32				†
58		300 100		
64	10 > 1000			
82			> 300 100	
101	†			

met doode leptospirae bij konijnen.

394			401			C O N T R O L E			
Cult. Moné 1 uur op 100° C.			Cult. Moné 1 uur op 100° C			Konijn no. 395		Konijn no. 404	
Reactie			Reactie			Levende cultuur Hickey (kl. stam)		Levende cultuur Lisboa (kl. stam)	
↓ ccm.	met klass. stam	met canicola	↓ ccm.	met klass. stam	met canicola	↓ ccm.	Reactie met klass. stam	↓ ccm.	Reactie met klass. stam
	0	0		0	0		0		
2	300	0	2	300	30	2		2	1000
4			4			4	1000	4	
				10000	300				10000
	> 3000	300	6			6	10000	4	
	+								10000
				100000	3000		> 10000		10000
							30000		

Wani's methode duurt vrij lang), bij het laatste kon de immunisatie wegens een intercurrente ziekte niet worden vervolgd. Ondanks de 2 injecties was bij deze dieren op resp. den 11den en den 13den dag de titer voor den klassieken stam reeds > 3000 .

Bij de overige vier dieren, die 3 injecties kregen, liep de titer hooger op:

no. 384	reageerde op den 14den dag	> 30000 (canicola).
no. 390	„ „ „ 19den „	10000
no. 393	„ „ „ 18den „	10000
no. 401	„ „ „ 20sten „	100000

Deze waarden liggen in dezelfde zône, als die welke we na vaccinatie met levende cultures zagen ontstaan. Het vaccin treedt dus ondanks de verwarming, tot zelfs op 100°C . gedurende één uur, als krachtig antigeen op. Hieruit kunnen we zeker de conclusie trekken, dat deze antigenen thermostabiel zijn.

Ook door het toevoegen van carbol werd de werkzaamheid van het vaccin niet ongunstig beïnvloed.

Evenmin vertoonde het beeld der reacties eenige afwijking van het normale: n.l. agglutinatatie alleen in de lagere verdunningen en lysis in de hoogere.

De verwantschaps-reacties met canicola (bij het eerste dier met een klassieken stam) in deze sera zijn gelijk aan die in de gewone anti-sera.

Met het serum van konijn 401 (titer 100000), gevaccineerd met gekookte leptospirae, werd een beschermingsproef bij caviae verricht. Vijf dieren werden intraperitoneaal geënt met $\frac{1}{2}$ ccm. van een lever-emulsie (afkomstig van een Weil-cavia) met talrijke leptospirae.

Drie dezer dieren werden tegelijkertijd met het bovengenoemde serum intramusculair ingespoten en wel:

- 1 ccm. onverdund serum bij cavia 3089.
- 1 ccm. 1 : 10 verdund serum bij cavia 3090.
- 1 ccm. 1 : 100 verdund serum bij cavia 3091. *)

De beide andere caviae dienden voor contrôle, zij gaan typisch aan Weil dood.

Bij de drie met serum behandelde dieren konden we, ondanks nauwkeurig onderzoek van peritoneaal vocht en bloed geen infectie vaststellen; ze stierven echter op resp. den 4den, 12den en 15den dag na de injectie. Bij de sectie was bij alle drie het macroscopisch

*) Het verdunnen geschiedde met een steriele 0.9 % NaCl oplossing.

Proef op beschermende werking van serum konijn 401 (t. 100.000).

P R O E F - C A V I A E			CONTROLE-CAVIAE	
3089	3090	3091	3092	3093
intraper. $\frac{1}{2}$ ccm. lever-em. + intramusc. 1 ccm. onverdund serum	intraper. $\frac{1}{2}$ ccm. lever-em. + intramusc. 1 ccm. $\frac{1}{10}$ verdund serum	intraper. $\frac{1}{2}$ ccm. lever-em. + intramusc. 1 ccm. $\frac{1}{100}$ verdund serum	intraper. $\frac{1}{2}$ ccm. lever-em.	intraper. $\frac{1}{2}$ ccm. lever-em.
† 4e dag	† 12e dag	† 15e dag	† 8e dag	† 10e dag
Onduidelijke doodsoorzaak. Geen leptospirae in peritoneaal-vocht en bloed gevonden. Na den dood ook geen lept. in de lever.			Beide met icterus, bloedingen en lept. in de lever.	

en het microscopisch onderzoek op Weil negatief; doch ook andere afwijkingen werden niet gevonden.

Deze proef verliep door den vroegtijdigen en onverklaarden dood der proefdieren onbevredigend. Een infectie kon echter bij de dieren niet worden aangetoond; leptospirae werden tijdens het leven niet gevonden in peritoneaalvocht en bloed, en na den dood evenmin in de organen. Naar onze meening pleit de proef toch voor een krachtige beschermende eigenschap van het serum, gezien het typisch verloop der contrôle. De proef dient evenwel herhaald te worden.

b. *Menschen*. Na dit veel belovende resultaat bij de konijnen, hebben wij dezelfde wijze van vaccinatie op het personeel van ons Instituut toegepast. Dichtgegroeide reïncultures werden op twee achtereenvolgende dagen een half uur op 70° C. verhit; dit geschiedde in dichtgesmolten buisjes, die pas vlak voor de injectie werden geopend. De cultures waren volkomen helder, zooals dit bij deze kweeken altijd het geval is. Een bacterieele verontreiniging is op deze wijze zeker uitgesloten.

De temperatuur van 70° C. is betrekkelijk willekeurig gekozen; we zagen in de voorafgaande konijnen-proeven dat zelfs 100° C. de antigene eigenschappen der leptospirae niet aantast.

Bij 5 personen werd het vaccin eerst onderhuids toegediend, begonnen werd met 2 ccm., en een week later 3 ccm. Plaatselijke reacties traden hierbij niet op, evenmin algemeene reacties. Dit is in overeenstemming met Wani's opgaven.

In tabel 23 zien we het verloop dezer vaccinatie. Bij Hoe. en Es., die hetzelfde vaccin op dezelfde tijden kregen, merken we een

TABEL 23. Kunstmatige immunisat

Vaccin.	Cultuur van den klass. stam „Koning”; $2 \times \frac{1}{2}$ uur op 70° C. verwarmd; 24 uur tusschentijd						Cultuur v		
Persoon	H O E.			E S.			M E E.		
	Injectie vaccin	Reactie met klass. stam	met canicola	Injectie vaccin	Reactie met klass. stam	met canicola	Injectie vaccin	Reactie met klass. stam	me canicola
dag: 1		0	0		0	0		0	0
1	subc. 2 ccm.			subc. 2 ccm.			subc. 2 ccm.		
8	„ 3 „	0	0	„ 3 „	0	0	„ 3 „		
9									
12					10				
15		0	> 10		> 10	0		100	0
16									
22								100	0
23		0	10		> 30	> 10			
29				i. ven. 3 ccm.	30	10		> 30	0
30		0	30						
33					100	30	subc. 3 ccm.		
37		0	30		> 1000	100			
41								300	0
43	i. ven. 3 ccm.	0	30		1000	100			
48		30	30					300	0
50		100	> 10						
57		100	10						
62		100	10		1000	10			

bij den mensch met doode leptospirae.

den klass. stam „Kok”; $2 \times \frac{1}{2}$ uur op 70° C. verwarmd, 24 uur tusschentijd

J U.			B O.			H A R.		
Injectie vaccin	Reactie met klass. stam		Injectie vaccin	Reactie met klass. stam		Injectie vaccin	Reactie met klass. stam	
	0	0		0	0		0	0
subc. 2 ccm.			subc. 2 ccm.			i. ven. 1 ccm.		
„ 3 „			„ 3 „					
						i. ven. 3 ccm.	300	0
	30	0		100	0			
							1000	10
	100	0		100	0			
	100	0		100	0			
i. ven. 3 ccm.			i. ven. 3 ccm.					
	300	0		300	0			
	1000	0		300	0			

eigenaardig verschil der reacties op. Het serum van Hoe. gaf tot 35 dagen na de tweede injectie niet de minste reactie met den klassieken stam. Wel agglutineerde het vanaf den 7den dag de canicola. Es. daarentegen kreeg den hoogsten titer voor den klassieken (> 30) en een lageren (> 10) voor den canicola-stam. De reactie van Hoe. is een geheel onverwachte. Ze herinnert ons aan de eveneens negatieve uitkomst, die ca. 5 jaar geleden in ons Instituut Hoffmann zag, toen hij bij zichzelf met een dergelijk vaccin een proef nam. Dit weerhield ons langen tijd dergelijke pogingen voort te zetten, tot de konijnen-proeven ons een anderen kijk gaven. Nu wij bij Hoe. schijnbaar een tweede mislukking zien, moeten wij hiermede rekening houden, althans wanneer het vaccin subcutaan is toegediend. Want na intraveneuze toediening, en dat is nog merkwaardiger, verschijnt bij Hoe. ineens een positieve reactie voor den klassieken stam, terwijl de onspecifieke voor canicola weer daalt.

Dergelijke paradoxe reacties werden ook enkele malen bij onze patiënten waargenomen. In het begin der periode, waarop de anti-stoffen voor het eerst verschijnen, beheerschte de reactie met den heterogenen stam het beeld bij hen, om in het verdere verloop van de ziekte den voorrang aan de specifieke reactie af te staan.

De intraveneuze vaccinatie bij Es., 3 weken na de laatste subcutane, gaf een hoogen titer, > 1000 , voor den klassieken en 100 voor den canicola-stam.

Bij Mee., Jü. en Bo., die met vaccin van stam „Kok” geënt werden, bleek de uitkomst zeer regelmatig te zijn. Twee à drie weken na de laatste onderhuidsche injectie was bij hen de titer 100; mede-agglutinatie met canicola bleef bij allen geheel achterwege. Na ruim 3 weken ontvingen ze hun derde injectie, en wel Mee. subcutaan, Jü. en Bo. intraveneus; hierdoor kwam bij alle drie de titer een week later op 300; ook nu bleef mede-reactie met canicola uit. Hier zien we dus een ander beeld dan na de vaccinatie met den eveneens klassieken stam „Koning”, waarbij de onspecifieke agglutinatie zoo op den voorgrond trad.

Op de 3de injectie, die 3 weken of meer na de laatste subcutane, werd toegediend reageerden drie der gevaccineerden met algemeene verschijnselen. Deze uitten zich bij Hoe., Jü. en Bo. ongeveer een uur na de *intraveneuze* injectie door een gevoel van koude, gepaard gaande met rillen en gapen. De toestand hield een half tot één uur aan, om plaats te maken voor een temperatuursverhooging tot ongeveer 38.5° C., lichte pijn in de lendenen en ledematen. Na enkele

uren namen deze symptomen af en den volgenden dag waren ze geheel verdwenen. Es. daarentegen had van de derde, intraveneuze, injectie niet den minsten hinder. Mee., waaraan de injectie onder de huid werd gegeven, voelde zich alleen enkele uren daarna iets onprettig zonder meer.

Door het acute verschijnen, $\frac{1}{2}$ tot 1 uur na de intraveneuze injectie, en het even snelle verdwijnen, maken deze verschijnselen geheel den indruk van overgevoeligheids-symptomen, veroorzaakt, of door het vaccin zelf, of, nog meer waarschijnlijk, door het konijnen-serum, waarvan het vaccin 10 % bevat. Vermoedelijk zullen dergelijke storingen, die op zichzelf slechts onbeduidend waren, te vermijden zijn door het vaccin in een sneller tempo in te spuiten. Dan zal men zelfs bij 3 injecties om de 5 dagen, of 2 binnen de 8 dagen beneden den kritieken tijd blijven, ca. 14—21 dagen, na afloop waarvan de anaphylactische toestand te verwachten is.

Bij Har. werd alleen intraveneus ingespoten, om te beginnen met 1 cc. en 8 dagen later met 3 cc. Van eenige hinderlijke gevolgen werd hier niets bespeurd, daarentegen was de titer tegen den gebruikten stam, ook stam Kok, reeds na 8 dagen tot 300 en na 16 dagen tot 1000 opgelopen.

Hoewel uit deze weinige gevallen geen vèrdragende conclusies mogen worden getrokken, toch verdienen de vaccinaties, intraveneus gegeven, stellig voortgezet te worden, vooral daar het geval Har. er op wijst, dat misschien met één injectie kan worden volstaan.

De vraag nu, of bij den mensch door vaccinatie werkelijk een bescherming tegen een natuurlijke infectie te behalen is, kan moeilijk beantwoord worden. Bekend is, dat het doorstaan van de ziekte van Weil een onvatbaarheid veroorzaakt en dat bij oud-patiënten jaren later de voorafgegane ziekte zich nog door een titer van 1 : 300, 1 : 100 of minder documenteert. Maar of deze agglutinatie- en lysis-titer, of zelfs het beschermend vermogen voor caviae*), ook als maatstaf voor den gevaccineerden mensch, m.a.w. als bewijs voor zijn bescherming mag worden aangezien, moeten wij in het midden laten. De proef op de som, die bij dieren door naënting met een smetkrachtigen stam mogelijk is, stuit bij den mensch toch op eenige bedenking, hoewel men bij aanwezigheid van een krachtig immuun-

*) 1 cc. van het serum van Es. (titer 1000) kan caviae beschermen tegen een gelijktijdige enting met virulente leptospirae, waaraan de contrôle-dieren ten gronde gingen.

serum, dat in geval van het aanslaan der her-enting onmiddellijk gebruikt kan worden, nauwelijks van een risico kan spreken.

Of we met avirulente levende stammen verder kunnen komen, dient nog te worden nagegaan.

Overigens zagen wij boven reeds, dat W a n i en M a j i m a gunstige resultaten van hun vaccinaties vermelden.

Daar de vaccinatie van ons personeel intensiever plaats vond, moeten wij concludeeren, dat ook zij beschermd zijn tegen een Weil-infectie.

Om de vaccinatie tegen Weil in het groot toe te passen, is in Nederland geen reden. Zelfs voor het zwemmende deel der bevolking is de kans op infectie te gering om ze door vaccinatie te beschermen. Alleen voor den enkeling, die gaarne zwemt, doch groote angst voor de ziekte heeft, is de enting een middel om zijn gemoedsrust terug te vinden en zich weer zonder vrees aan de zwemsport over te geven.

Voorts zijn het bepaalde beroepen, waarbij de blootstelling aan de ziekte grooter is, met name menschen, die in kolenmijnen, abat-toirs, en visch-afslagen werken, of de riool- en kanaalarbeiders. *) Door de werkplaatsen vrij van ratten te maken en te houden is de ziekte bij een deel van hen te voorkomen. In Nederland zien we heden onder de genoemde arbeiders niet opvallend veel Weil-infecties, vaccinatie is dan ook bij hen momenteel onnoodig.

Anders staat het met het personeel van laboratoria, waar met leptospirae gewerkt wordt; meermalen zijn bij hen Weil-infecties, waaronder met doodelijken afloop, beschreven (Uhlenhuth en Fromme, Adamski, Goebel, Schüffner e.a.). Bij deze kleine groepen personen is vaccinatie tegen Weil dan ook zeker op haar plaats.

Maar ook in andere laboratoria, waar alleen gewone proefdieren gehouden worden, is de kans op Weil-infecties verhoogd. Immers ook lamme, witte ratten kunnen leptospira-drager zijn (Uhlenhuth en Zimmermann; Korthof, vgl. mondelinge mededeeling). Zulke proefstallen lokken altijd wilde ratten aan; het contact is dus allicht aanwezig. Men moet daarom steeds aan Weil denken, wanneer iemand, die bij zijn werk met ratten te doen heeft, of die bij het personeel van een dergelijk instituut behoort, plotseling ziek wordt.

*) Zie ook bij Martin-Pettit, Uhlenhuth, Fairley, Alston en Brown, Davidson en Campbell, Seyfarth e.a.

Het vroegtijdig stellen der diagnose, gevolgd door toediening van immuun-serum, kan dan levensreddend zijn.

In Nederland zijn gedurende de laatste jaren vijf personen, die met ratten of leptospirae werkten, met Weil geïnfecteerd, één hunner overleed aan de infectie. Dit mag als een waarschuwing, maar tevens als een aansporing worden beschouwd, het betreffende personeel van deze laboratoria te vaccineeren.

HOOFDSTUK X.

Samenvatting.

1. In Nederland begint in 1924 de bacteriologisch gefundeerde diagnose van de ziekte van Weil. Tot en met 1936 zijn in totaal 756 Weil-infecties vastgesteld, waarvan er 73 letaal verliepen.

Nederland staat met dit cijfer aan de spits van de Europeesche landen. Het eenige land, dat onze cijfers benadert, is Frankrijk, waar in de jaren 1924 t/m 1932 263 gevallen zijn opgegeven (B. E r b e r, Institut Pasteur, Paris). In Nederland waren er in hetzelfde tijdperk 320. Daar Nederland slechts $\frac{1}{5}$ deel der bevolking van Frankrijk bezit, zou men deze 320 nog met 5 moeten vermenigvuldigen, om het overwicht van Nederland, al is dit een twijfelachtig voorrecht, overtuigend naar voren te doen komen. De besmetting concentreert zich sterk op de groote steden der Westelijke provincies, Zuid- en Noord-Holland en Utrecht.

Omdat bij dit officieele materiaal andere bijzondere opgaven ontbreken, moesten wij ons tot het gedeelte beperken, waarvoor de hulp van ons Instituut werd ingeroepen en waarover meer gegevens verzameld konden worden. Van de 756 gevallen waren dit 334, dus bijna de helft; voldoende om een zuiver beeld te mogen verwachten. O.a. komt in beide reeksen de sterke toename in het jaar '32 overeenstemmend uit.

Opvallend is de verdeeling over de geslachten en leeftijden; de vrouwen nemen slechts $\frac{1}{11}$, de kinderen nog minder, slechts $\frac{1}{37}$ deel van het geheel in. Of bij hen de ziekte lichter verloopt, en daardoor moeilijk herkend wordt, of dat vrouwen en kinderen minder kans op besmetting hebben, werd in het midden gelaten.

Bij $\frac{2}{3}$ van de gevallen (223) was een duidelijke icterus aanwezig. De letaliteit op deze groep berekend bedroeg 18 %; met opzet werd de groep der gevallen zonder icterus (111), die allen herstelden, buiten de berekening gelaten. Hun diagnose is moeilijk en daarom wisselt hun aandeel onberekenbaar. Door het opvallende symptoom

icterus wordt ineens een gemakkelijker te diagnostiseeren groep afgescheiden.

Verdeeld over de maanden vertoont ons materiaal, evenals het officieele, een hoogen zomertop in de maanden Juli, Augustus en September. In hoofdzaak is deze afhankelijk van de zwemsport, die vooral in de jaren '32 en '33 het overgrootste gedeelte leverde. In 1936 is zijn aandeel sterk afgenomen, vermoedelijk door het betere toezicht op de zweminrichtingen. Dat ook het visschen, onder bezigheden opgenomen, een kans op besmetting inhoudt, is pas de laatste jaren bekend geworden.

2. Achtereenvolgens worden de resultaten besproken, die met de verschillende diagnostische methoden werden behaald. De meest ideale uitkomst geeft de centrifugatie van het plasma, doordat de diagnose in de eerste dagen op slag microscopisch kan worden gesteld. Helaas is de beteekenis der methode beperkt, omdat de concentratie om redenen, die ons nog duister zijn, slechts gelukt in $\frac{1}{4}$ der gevallen, waarin de aanwezigheid van leptospirae achteraf bewezen werd.

De cavia-proef heeft de meeste kans op slagen met patiëntenbloed van de eerste 4 dagen der ziekte. Daarna neemt de kans af, toch konden we nog met bloed van den 10den dag de ziekte op caviae overbrengen. Wanneer men dus het bacteriologisch onderzoek de volle kans wil geven, verdient de cavia-proef tot dit tijdstip toegepast te worden. Later kan men de leptospirae nog in de urine aantoonen.

De serum-titer van Weil-patiënten kan tot in de tweede maand nog belangrijk stijgen. Hierom en ook omdat de patiënt dan weer wat krachtiger is, kan men tot de derde maand wachten met het afnemen van reconvalescenten-serum voor therapeutische doeleinden.

3. De sero-reacties van patiënten, waarbij de verwekker werd aangetoond, zijn het voornaamste materiaal ter beoordeeling van de waarde dezer onderzoeken.

In al onze gevallen (87) werd de sero-reactie positief en wel één maal slechts tot 1 : 300, meestal echter veel hooger, tot 1 : 10000 en meer. Bij een zoo sterke concentratie van anti-lichamen mag dan ook de diagnose Weil voor het betrokken geval zonder meer worden uitgesproken. Bij lagere titer geeft het waarnemen van de stijging den doorslag. Met nadruk wordt hier nog eens op gewezen, dat elke Weil-infectie, die door het aantoonen van de leptospira boven elken twijfel was verheven, bij voldoende observatie steeds door een

positieve sero-reactie was gekenmerkt! Ten onrechte wordt dus de betrouwbaarheid van de sero-reactie betwijfeld.

Tusschen het titer-verloop van gevallen met en zonder icterus, bestond geen verschil.

4. De overige 247 patiënten, die door de sero-reacties herkend werden, zijn volledigheidshalve ook opgegeven.

5. Injectie van anti-serum heeft geen invloed op het titer-verloop, wanneer het geschiedt, als er reeds icterus aanwezig is, d.w.z. als het betrekkelijk laat gegeven wordt. Na *vroegtijdige* toediening van immuun-serum bij 5 patiënten, waarbij bovendien geen icterus optrad, bleven alle titers beneden de 10000. De cijfers zijn te klein, om hieruit den regel af te leiden, dat vroegtijdige toediening van immuun-serum de productie van anti-stoffen remt.

Onder bijna 600 personen, die niet aan de ziekte van Weil leden, gaf 1 % een zwak positieve sero-reactie; de hoogste hiervan haalde 1 : 100 en daar deze reactie gedurende den tijd van het onderzoek constant bleef, hadden wij met een anamnestiche of met een onspecifieke reactie te doen. 99 % waren volkomen negatief.

Bij 3 andere niet-Weil-lijdens werd in den aanvang eener ziekte abusievelijk anti-serum ingespoten; bij alle drie ontstonden serum-titers (tot 100 en lager), die binnen twee weken bij twee hunner weer verdwenen waren. Voor een foutieve interpretatie dezer reacties bestaat geen gevaar, want de titer blijft onder de 300, de grens, waarop wij volgens ons standaard-materiaal mogen afgaan.

De passieve immunisatie werd ook bij konijnen gevolgd. Na intraveneuze serum-injectie nam reeds binnen enkele uren de hoeveelheid der ingespoten anti-stoffen (volgens de sero-reactie) belangrijk af; de rest verdween onder geleidelijke daling, na 8 à 10 dagen uit het bloed der dieren.

De intra-musculaire injectie veroorzaakte pas na 6 à 24 uur den hoogsten serum-titer, daarna echter kwam het verloop met dat der intraveneus ingespoten dieren overeen.

Twee konijnen werden resp. $\frac{1}{2}$ uur en 2 dagen van te voren met een virulente cultuur ingespoten, om na te gaan of de toediening van anti-serum bij bestaande infectie een andere kromme zou veroorzaken. Beide dieren toonen tot den 2den dag nagenoeg geen verschil. Vanaf den derden dag kan op het resultaat niet meer worden afgegaan, omdat het beeld vertroebeld wordt door het actieve proces. Deze proef geeft dus geen verklaring voor de negatieve

reacties, die bij drie Weil-patiënten, daags na een serum-injectie aanwezig waren.

6. Het formol-antigeen, dat uit leptospira-kweeken bereid wordt, is in de praktijk met goed gevolg bij de sero-diagnostiek te gebruiken. Chemisch zuivere formaline (Z u e l z e r), maar vooral een lage concentratie van formaline ($\frac{1}{2}$ %) schijnt de duurzaamheid van het antigeen te verhoogen.

De titer van de agglutinatie (lysis kan niet optreden) is in doorsnede slechts weinig lager dan de titer met levende leptospirae.

7. De stammen, die door ons uit patiënten in Nederland werden gekweekt, behooren allen, op twee na, tot de soort *L. icterohaemorrhagiae*, s. *icterogenes*, door ons de klassieke genoemd; de twee uitzonderingen behooren tot het apart staande *canicola*-type.

104 sinds 1932 uit ratten geïsoleerde stammen werden allen geïdentificeerd als klassieke.

Uit 17 spontaan geïnfecteerde honden werd in samenwerking met Prof. Klarenbeek, 6 maal een klassieken en 11 maal een *canicola*-stam gewonnen. Dit en de vele serologisch vastgestelde *canicola*-infecties bij honden maken het duidelijk, dat de hond het tot nu toe bekende virus-reservoir der *canicola* is.

8. De klassieke stammen afkomstig uit Nederland of uit andere Europeesche landen, leveren bij konijnen hoogwaardige sera, die allen vrijwel overeenstemmen. Bij patiënten-sera kan men daarentegen soms afwijkingen zien, die zich hierin uiten, dat het serum hooger met den eenen stam, dan met een anderen reageert. Dit zijn geen regelmatige verschillen; een volgenden keer kan het verschil weer geheel opgeheven zijn. Omdat we hier met uitzonderingen te maken hebben, misschien als gevolg van een zekere labiliteit der antigene eigenschappen, of van de individueel verschillende reactie van het menschelijke lichaam, kunnen ze de groote lijn, die door het geheel der in Europa gekweekte stammen loopt, en die wij daarom de klassieke noemen, niet storen.

De juistheid hiervan wordt bevestigd door de ontdekking van de *L. canicola*. Deze heeft weliswaar met den klassieken stam een zekere verwantschap, die zich kenmerkt door een mede-agglutinatie. Maar deze mede-reactie is steeds min of meer lager dan de specifieke reactie, een feit, dat op de bijzondere antigene structuur der *canicola* moet berusten.

De besmetting met *canicola* mag op grond hiervan, naast de „klassieke Weil” als een tweede leptospirosis worden aangezien. Epi-

demiologisch wordt deze stelling gestaafd, doordat de canicola-infectie zich niet als een epizootie der ratten, doch der honden voor-doet en bij hen een eigen klinisch beeld (K l a r e n b e e k) geeft. Dit laatste schijnt ook voor de besmetting bij den mensch te gelden. Voor zoover althans de tot nu toe in Nederland waargenomen ge-vallen (11) een oordeel veroorloven, schijnt de infectie met *L. canicola* bij den mensch zelden of nooit geelzucht te veroorzaken.

Als derde in Europa voorkomende leptospirosis staat naast de „klassieke Weil” en de canicola-koorts, de modderkoorts, die in Silezië en Rusland in den zomer voorkomt, doch in ons land nog niet gezien is. De bij haar behoorenden *L. grippotyphosa* is nog veel verder van de klassieke verwijderd en vertoont slechts bij groote uitzondering sporen van een verwantschaps-reactie. Ook bij de modderkoorts geven de kliniek en de epidemiologische eigen-schappen het volle recht aan de ziekte een afzonderlijke plaats aan te wijzen.

Wij plaatsen ons hiermede opnieuw lijnrecht tegenover de voor-stelling van Baermann en Zuelzer, welke door Schloss-berger c.s. kortelings is overgenomen. Volgens de laatsten kunnen de Europeesche leptospirae niet in serologisch scherp te onder-scheiden soorten worden ondergebracht.

9. Uitvoerig wordt de bereiding van hoogwaardige immuun-sera besproken, zoowel met levende, als met door verhitte gedooide cultures.

De uitwerking van de verhitte werd gecontroleerd door direct microscopiseeren in het donkere veld ter beoordeeling van de be-wegelijkheid, door overenten op verschen voedingsbodem en door enten op caviae.

Het bleek, dat verwarmen op 50° C. gedurende een half uur vol-doende is, om de leptospirae te doden, m.a.w. microscopisch was geen bewegelijkheid te zien, cultuur en dierproef bleven negatief.

Na 20 minuten verwarmen op 50° C. waren nog enkele leptospirae bewegelijk, cultuur en dierproef bleven ook nu negatief.

Na 10 minuten schijnt de bewegelijkheid nauwelijks geleden te hebben, ook de cultuur slaat aan; de geënte caviae blijven evenwel gezond.

Het microscopische onderzoek geeft dus het langst aan of er nog eenig leven is overgebleven, de cavia-proef daarentegen verraadt reeds lichte beschadigingen van de leptospirae, doordat het dier niet meer ziek wordt. Blijkbaar worden door de korte verwarming (10

minuten) elementen, die als drager der smetkracht fungeeren, buiten werking gesteld.

In de volgende cultuur-passages komt echter de volledige pathogeniteit weer terug, de verwarming veroorzaakt dus slechts een tijdelijke verandering (adaptatie van van Loghem).

De leptospirae, die door verwarming waren gedood, wekten bij konijnen immuun-sera op, die voor de met levende cultures behaalde sera niet onder schijnen te doen.

De antigenen moeten als thermostabiel beschouwd worden, daar hetzelfde resultaat ook met gekookte leptospira-cultuur werd bereikt.

De immunisatie bij den mensch werd uitgevoerd met leptospira-kweken, die op twee achtereenvolgende dagen een half uur op 70° C. waren verwarmd; de verkregen serum-titers waren aanzienlijk en varieerden tusschen 100 en > 1000. Intraveneuze vaccinatie schijnt sneller een hooge reactie te geven dan subcutane.

Over de duurzaamheid van den immunisatie-toestand ontbreekt ons in dit stadium nog elke ondervinding. Hier kunnen wij alleen afgaan op de gunstig luidende gegevens van de Japansche onderzoekers. Mocht toch blijken, dat de bescherming slechts korten tijd aanhoudt, dan zou men tot vaccinatie met avirulent geworden levende stammen, kunnen overgaan en zien, of hiermede een duurzamer resultaat kan worden bereikt.

Vaccinatie tegen Weil komt in ons land voorloopig alleen in aanmerking voor het personeel van laboratoria, dat door werken met ratten en leptospirae in een zeker gevaar verkeert.

Summary.

1. In 1924 the first case of Weil's disease in the Netherlands has been diagnosed with the help of bacteriological examination. Up till the end of 1936 756 persons, suffering from Weil's disease, have been detected by this method; out of these cases 73 proved fatal.

Of all European countries the Netherlands show the highest incidence of this disease. No other country has returns to show approaching the dutch, except France where 263 cases were registered from 1924 till 1932 (B. Erber, Institut Pasteur, Paris). During the same years the Netherlands had 320 cases, among a population of about $\frac{1}{5}$ of the French. So the incidence of Weil's disease among our people is actually more than 6 times as high as among the French, an advantage they are not likely to grudge us.

The incidence is highest in the cities of the Western provinces South-Holland and Utrecht.

We shall have to limit our discussion to the cases we have examined ourselves as the official returns are too poor in details to be of any use. Fortunately we were asked for help in fixing the diagnoses of 334 cases and so we were able to collect all the information we desired in but little less than half of the total number of cases. This material, we believe, is sufficient to yield reliable data. As an instance we may point to the sudden rise of the disease in 1932 which is as marked in our own material as in the official returns.

The sex and age distribution of the disease shows a striking preference for men. The incidence in men is 11 times higher than in women and 37 times higher than in children. Whether men are more exposed to infection, or women and children more prone to mild attacks which are left undiagnosed, is a point we must leave undecided.

Two thirds of the patients (223) showed icterus to a marked degree, 18 pct. of them died. All of the 111 patients who had no icterus recovered. In assessing the case-fatality we have discarded the cases without icterus, they are difficult to diagnose and so many escape notice. The symptom of icterus, on the other hand, facilitates the

diagnosis to such an extent that few cases showing this symptom elude the physician's attention.

Our own material, as well as the official returns, show a marked seasonal incidence with a high peak in July, August or September. This is principally due to the fact that swimming in the open is most popular during these months. In 1932 and 1933 the majority of the patients acquired their infection in this way. In 1936 swimming as a cause of infection was of much less importance, probably as a consequence of the greater attention paid to the conditions prevalent in the open swimming pools. It is only during the last year or two, that we have become aware of the importance of angling as another sport favouring infection.

2. With regard to the methods of bacteriological diagnosis, we found concentrating the *Leptospirae* by centrifuging the blood plasma the best of all, because it yields already results within the first days of illness. Unfortunately, for reason we cannot fathom as yet, we failed to effect this concentration in $\frac{3}{4}$ of the cases in which *Leptospirae* were detected on subsequent examinations.

Inoculating guinea-pigs with the patients' blood often proves successful during the first four days of illness. Later on the chances of success rapidly diminish, although we had positive results as late as the 10th day. Hence it is advisable not to discard this test till after that day.

The lytic and agglutinatorv titre of the patients' serum may show a considerable increase continuing far into the 2nd month after the illness commenced. Hence it is not necessary to expose convalescents to the debilitating effect of bleeding in order to obtain serum for therapeutical purposes. One can safely await the end of the second month before subjecting them to this operation.

3. The serological reactions of the 87 patients *in whom the Leptospirae had been detected* were the principal object of the investigations recorded in this book, as they afford us with the data we require in order to assess the diagnostic value of these serological reactions in patients who failed to show *Leptospirae*.

In all these cases the serum showed agglutination and lysis. Once the titre was low (1 in 300), usually it rose to 1 in 10000 or more. If the diagnosis is to be based on the serological reaction of the patients' blood only, such a high titre may be safely accepted as an undeniable proof that he was suffering from Weil's disease. Even a lower titre (but not under 1 in 300) may still be accepted as

decisive, provided it shows a gradual increase in a series of observations. We wish to emphasize the fact that all cases of Weil's disease diagnosed by the finding of *Leptospirae* showed positive serological reactions, so long as the examination was continued long enough.

Cases with icterus and without did not differ with regard to the variations in the titre of their serological reactions.

4. For the sake of completeness we have added (Table 6 and 7, pag. 28, 29 and 30) the serological reactions of the patients suffering from Weil's disease in whom no *Leptospirae* were found.

5. An injection of convalescent-serum (anti-serum) does not influence the subsequent serological reactions of the patient, provided it is given at a time when icterus has already developed. In 5 patients anti-serum was given at an earlier date, they did not develop icterus and the titre of the serum never rose to 1 in 10000. We admit, that these cases are too few in number to allow of concluding that an early application of serum treatment interferes with the production of anti-bodies.

The serum of nearly six hundred persons was tested for the presence of agents lytic or agglutinator to *Leptospirae*. One percent of them proved positive; the highest titre observed was 1 in 100; it remained at that level during the whole term of examinations. We do not know whether this person had previously suffered from an unrecognized attack of Weil's disease, or whether this reaction was an unspecific one.

Three patients, not suffering from Weil's disease, were given an injection of anti-serum by mistake. All developed a positive serum-titre, which never rose above 1 in 100 and which disappeared, in two of them, after a fortnight.

These low agglutinator and lytic titres can never lead to erroneous conclusions, so long as one holds to the conclusion, derived from our standard material of 87 patients mentioned above, that a titre below 1 in 300 is always inconclusive.

The unintentional passive immunization, mentioned above, has been repeated in rabbits (this time intentionally) by intravenous injection. The result was the same. The quantity of antibodies, tested by the serological reactions of the serum, rapidly dropped within a few hours, more gradually after that time. After 8 to 10 days no more antibodies were to be detected. Intramuscular injection acted more slowly. The highest titre was not reached till 6 to 24 hours

later. The subsequent events, however, were the same as those we found after intravenous injection.

In order to ascertain whether a previous inoculation with *Leptospira* would cause any change in the course of events following the injection of anti-serum as detailed above, we inoculated two rabbits with virulent *Leptospirae* and injected the anti-serum $\frac{1}{2}$ hour later into one rabbit and 2 days later into the other. Up to the second day the two animals showed serological reactions similar to those found in uninfected animals. After that time the active process of infection disturbed the normal course of events. Hence this experiment does not explain why the serological reactions were negative in three patients, suffering from Weil's disease, on the day following the administration of anti-serum.

6. The formalized antigen prepared from *Leptospira*-cultures proved highly satisfactory in the practice of sero-diagnosis, provided the formaline used is chemically pure (Zuelzer). Moreover the formaline should be highly diluted ($\frac{1}{2}$ %); this precaution seems to render the antigen more durable.

The formalized *Leptospirae* are no longer subject to lysis. Hence the serological titre refers to agglutination only. This titre is but little lower than that observed in living *Leptospirae*.

7. All strains, but two, isolated from Dutch patients were identified as *L. icterohaemorrhagiae* (icterogenes), the „classical type”. The two exceptional strains were identified as *L. canicola*. All of the 104 strains of *Leptospirae* isolated from rats since 1932 belong to the species *L. icterohaemorrhagiae*. The rat never is a carrier of *L. canicola*.

In collaboration with Prof. Klarenbeek, we isolated 17 strains of *Leptospirae* from 17 dogs. Six were identified as *L. icterohaemorrhagiae* and 11 as *L. canicola*. This result, together with the numerous serologically ascertained findings of canicola-infections in dogs leave no doubt as to the dog being the natural host of this parasite.

8. Rabbits immunized to *L. icterohaemorrhagiae*, produce sera of a high titre which practically react identically with any of the strains of *L. icterohaemorrhagiae*, whatever the origin of the strain (Dutch or from other European countries) used for immunizing the rabbits. In human patients there exists a greater variety of serological reaction: some strains are agglutinated and dissolved at a higher titre than others. This serological preference for a particular strain is not

constant, at the next examination of the same patient's serum it may have completely disappeared. Hence we need not pay too much attention to these individual and evanescent variations due, no doubt, to a certain degree of lability of the patient's antigenous power. In any case, they ought not to make us doubt of the fundamental homogeneity of the strains of *L. icterohaemorrhagiae* distributed over the whole of Europe.

The existence of this fundamental homogeneity has been thrown into relief by the discovery of *L. canicola* which, by its general likeness to the classical type, together with the small but constant serological differences (coagglutination, never reaching the specific level), emphasizes the real value of these differences.

Consequently the disease caused by *L. canicola* is a second leptospirosis, etiologically distinct from typical Weil's disease as caused by *L. icterohaemorrhagiae*. This contention is confirmed by veterinary medicine which has made out a peculiar clinical picture of this disease, epizootic in dogs. In man *L. canicola* likewise seems to cause a disease which is clinically distinct from Weil's disease. This we gather from the fact that none of the 11 cases of human canicola disease, observed till now, showed the faintest trace of icterus.

The third leptospirosis known in Europe, the „bogfever” of the summer season in Silezia and Russia, has never been seen in this country.

The causative agent, *L. grippotyphosa*, is much less closely related to *L. icterohaemorrhagiae* than is *L. canicola*, coagglutination is of very rare occurrence. In bogfever, like in canicola-fever, clinical and epidemiological peculiarities fully justify its being set apart from the other leptospiroses.

In making this statement we realize our fundamental disagreement with the views Schlossberger and his collaborators have recently advanced. These views bear a close resemblance to those expressed by Baermann and Zuelzer, which our Institute has always strongly opposed. They hold that the pathogenic *Leptospirae* cannot be divided into well-defined groups. This assertion refers to the Indian and Japanese types as well as to the European. We greatly apprehend that such views will lead to nothing but a further entanglement of the threads of this, already knotty, problem.

9. With regard to the preparation of immune-sera of a high titre by the injection of living leptospirae or of those killed by heat, the following may be noted. The effect of the heating was checked by

ascertaining the presence or absence of motility under the microscope (dark ground illumination), by culturing and by the animal test. By these checks it was proved that heating for half an hour at 50° C. was sufficient to kill the *Leptospirae*. Twenty minutes heating left some *Leptospirae* motile, but they could not be cultured and the animal test proved negative. Ten minutes heating leaves the motility of the *Leptospirae* almost unaffected and they grow in cultures, but they do not infect guinea pigs.

So the motility is a sign of life, which resists the longest to heating, cultivability is the next and pathogenicity is the least resistant of all. But it is easily restored on subculturing the strain which has become non-pathogenic. Hence, heating causes a temporary variation only (adaptation, according to van Loghem).

Leptospirae killed by heating and injected into rabbits provoke the appearance of antibodies, which are in no way inferior to those produced by the injection of living *Leptospirae*. The same applies to *Leptospirae* killed by boiling, and so we conclude that their antigens are not destroyed by heat.

Active immunization of human beings was carried out by the injection of *Leptospirae* from cultures heated to 70° C. on two subsequent days. The serum of persons, treated in this way, showed a titre varying from 1 in 100 to 1 in over 1000. Intravenous injection of the vaccine seems both to accelerate and to enhance the production of antibodies.

We do not know, as yet, how long the effect of this immunization is likely to last. All we have to rely on is the favourable report of the Japanese workers. If further experience shows the effect of the immunization to wear out within a short space of time, it will be advisable to try whether vaccination with living *Leptospirae* which have become avirulent produces a more lasting effect.

At present vaccination to Weil's disease in this country is practicable only for the purpose of protecting laboratory personnel who, by their occupation, stand a more than ordinary risk of infection.

Zusammenfassung.

1. In Holland erscheint erst seit dem Jahre 1924 die Diagnose Weilsche Krankheit, und zwar auf Grund bakteriologischer Untersuchung. Bis Ende 1936 wurden insgesamt 756 Fälle offiziell angegeben, von denen 73 starben.

Holland steht mit dieser Zahl an der Spitze der europäischen Länder. Es folgt Frankreich, wo in dem Zeitraum von 1924—'32 im ganzen 263 Fälle zur Kenntnis kamen (B. Erber, Institut Pasteur, Paris). Die entsprechende Zahl für Holland würde 320 sein; berechnet auf die 5 mal grössere Bevölkerung in Frankreich, ergibt sich für Holland das zweifelhafte Vorrecht einer 6 mal höheren Dichtigkeit der Infektion! Die Infektion konzentriert sich stark auf die westlichen tiefliegenden Provinzen, Süd- und Nord-Holland, sowie Utrecht.

Da bei den offiziell gemeldeten Fällen nähere Angaben fehlen, beschränken wir uns auf das Material, wofür die Hilfe unseres Institutes einggerufen wurde, und wovon uns Einzelheiten des Verlaufs bekannt wurden. Von den 756 waren dies 334 Fälle, d.h. etwas weniger als die Hälfte, genug, um ein richtiges Bild zu geben. U.a. kommt auch hierbei das starke Ansteigen der Krankheit im Jahre 1932 zum Ausdruck.

Auffallend ist die Verteilung über Geschlecht und Lebensalter. Die Frauen nehmen nur $\frac{1}{11}$, die Kinder sogar nur $\frac{1}{37}$ von der Gesamtzahl Anteil. Ob bei ihnen die Krankheit leichter verläuft und darum nicht erkannt wird, oder ob Frauen und Kinder wirklich weniger infiziert werden, bleibt eine offene Frage.

Bei $\frac{2}{3}$ der Fälle wurde ein ausgesprochener Icterus gemeldet. Die Letalität unter diesen 223 betrug 18 %. Die 111 icteruslosen Kranken, die alle genasen, wurden bei der Berechnung ausser Acht gelassen, da sie die Sterbeziffer in ganz willkürlicher Weise beeinflussen.

Verteilt auf die Monate ergibt unser Material ebenso wie das offizielle einen breiten Sommergipfel während Juli, August und September. In der Hauptsache ist dies Ansteigen vom Schwimmsport abhängig. Das kam vorallem in den Jahren 1932 und 1933 zum Ausdruck; in den folgenden Jahren sinkt der Anteil des Schwimmens anscheinlich, wahrscheinlich als Folge einer speziell gegen die Ratten

gerichteten Versorgung der Schwimmanstalten. Dagegen lieferte der Fischersport in den letzten Jahren reichlicher „Weil“-Kranke.

2. Der Reihe nach werden die Resultate besprochen, die mit den verschiedenen diagnostischen Methoden gewonnen werden konnten. Voran steht das Zentrifugieren des Blutes, das in den ersten Tagen der Krankheit die Diagnose mit einem Schlag mikroskopisch ermöglicht. Leider glückt die Methode aus noch unbekannten Gründen nur in $\frac{1}{4}$ aller der Fälle, in denen der Tierversuch später die Anwesenheit der Leptospiren bewies.

Impfung von Meerschweinchen gibt in den ersten 4 Tagen die besten Resultate, später wird die Aussicht auf ein Anschlagen der Krankheit geringer, doch konnte die Impfung noch bis zum 10. Tag erfolgreich sein. Noch später, selbst nach Wochen und Monaten kann die Leptospire im Urin nachgewiesen werden.

Mit dem Abnehmen von Serum zu therapeutischen Zwecken kann man darum warten, bis der Patient wieder zu Kräften gekommen ist. Zuletzt bleibt die serologische Reaction auf Immunkörper, die bis zum Ende des zweiten Monats an Stärke zunehmen kann.

3. Das wertvollste Material für die Beurteilung der Seroreaction bildeten die 87 Fälle, in denen der Erreger auf die eine oder andere Weise nachgewiesen werden konnte. Hier wurden regelmässig Immunstoffe geformt, und zwar meistens sehr reichlich, bis zu einem Titer von 1 : 10000 und darüber. Nur einmal kam der Titer nicht höher als 1 : 300. Die Sicherheit der Diagnose wird durch Wahrnehmen der Steigung erhöht. Wir betonen aber ausdrücklich noch einmal, dass wir keine Fälle kennen, in denen eine Serum-Immunität (durch Agglutination und Lysis nachzuweisen) ausblieb! Wir halten daher die Seroreaction im Gegensatz zu anderen Autoren für ausserordentlich zuverlässig. Zwischen Fällen mit und ohne Icterus bestand, was die Seroreaction betrifft, kein Unterschied.

4. Der Vollständigkeit halber werden auch die Titer der übrigen 247 Fälle, die allein durch die Seroreaction erkannt wurden, aufgeführt.

5. Die Verabreichung von Antiserum hat keinen Einfluss auf den Titerverlauf, wenn sie *nach* Ausbruch des Icterus geschieht. Wird das Serum *früher* gegeben, dann scheint es, als ob die Immunkörperbildung etwas zurückbleibt. Unter beinahe 600 Personen, die nicht an Weilscher Krankheit litten, gab 1 % eine schwach positive Reaction. Die höchste hiervon erreichte 1 : 100, und blieb dies

dauernd; wahrscheinlich hatten wir es hier mit einer retrograden Reaction, von einer früheren Infektion stammend, zu tun; bei den übrigen konnte es sich ebenso gut um eine Unspezifische handeln.

Drei andere Kranken, die später als an einer anderen Krankheit leidend erkannt wurden, erhielten „Weil“-Serum. Die dadurch positiv gewordene Seroreaction, darunter eine von 1 : 100, verschwand im Verlauf der zweiten Woche aus dem Blute. Eine Störung der Diagnose kann hierdurch nicht verursacht werden, vor allem nicht, wenn man das Serum mehrfach untersucht.

Bei passiver, intravenöser Immunisierung von Kaninchen ergeben sich ähnliche Verhältnisse. Die nach Einspritzen des Immunserums momentan gestiegene Seroreaction wurde nach 8 bis 10 Tagen wieder negativ. Gab man das Immunserum intramuskulär, dann kam der Titer erst nach 6—24 Stunden auf den Höhepunkt, im übrigen war der Verlauf der gleiche. Daran änderte sich auch, wenigstens für die ersten 4 Tage, nichts, wenn das Immunserum Kaninchen eingespritzt wurde, die kurz zuvor, oder zwei Tage früher virulente Kultur erhalten hatten; allein übernahm dann nach dem 3—4 Tag die aufkommende Infection die weitere Immunisierung. Dies Experiment, das über den Verbleib des Serums bei infiziertem Tier Aufschluss gab, verlief anders wie beim infizierten Mensch, wo tags nach der Verabreichung das Immunserum nicht mehr nachzuweisen war. Dies bleibt vorläufig unerklärt.

6. Formalinculturen sind für die Serodiagnostik äusserst zweckmässig. Chemisch reines Formalin (Zuelzer), vor allem aber geringe Concentration ($\frac{1}{5}$ %) scheinen die Haltbarkeit des Vaccins merklich zu erhöhen. Der Titer blieb im Durchschnitt um ein geringes tiefer als der von lebender Kultur.

7. Die 83 Stämme, die wir in Holland aus Patienten züchteten, gehören mit Ausnahme von zweien der klassischen Type an, L. icterohämorrhagiae s. icterogenes, deren erster in Europa gezüchteter Stamm, RGA Berlin auch im Besitz unsers Institutes ist. Die zwei Ausnahmen sind der neue Typus, L. canicola.

Aus Ratten wurden seit 1932 104 Stämme isoliert, es waren *ausnahmslos* klassische. Dagegen konnten aus 17 spontan infizierten Hunden (in Zusammenarbeit mit Prof. Klarenbeek) 6 mal der klassische, und 11 mal der Canicola Stamm gewonnen werden. Der Hund dient daher als Wirtstier für beide Typen, die Ratte, bisher wenigstens in Holland, *allein* für die klassische.

8. Die klassischen Stämme aus Holland und anderen europäischen Ländern liefern beim Kaninchen hochwertige Sera, die bis auf geringfügige Abweichungen alle übereinstimmen. Patienten-sera dagegen geben ausnahmsweise stärker abweichende Werte mit dem einen oder anderen Stamm, jedoch ohne das eine Gesetzmässigkeit zu erkennen wäre. Wir betrachten die Ausnahmen entweder als die Äusserung einer gewissen Labilität der antigenen Eigenschaften oder vorhandener aber sich nicht immer geltend machender Partial-Antigene, oder aber als einer individuell verschiedenen Gegenwirkung des menschlichen Körpers. Wie uns zahllose Vergleiche lehren, können aber diese Ausnahmen die grosse Linie, die durch die europäischen Stämme des klassischen Weil läuft, und sie zu einer Einheit macht, nicht stören.

Eine Bestätigung unserer Auffassung war die Entdeckung der *L. canicola*. Sie besitzt ihre eigene, scharf gezeichnete antigene Structur, obwohl eine gewisse Mitagglutination auf ihre Verwandtschaft mit der klassischen *Leptospire* weist. Die Infection mit *L. canicola* kann daher als eine zweite *Leptospirosis* in Europa angesehen werden. Diese Annahme wird durch besondere epidemiologische Eigenheiten gestützt: sie ist eine Epizootie der Hunde. Ferner zeichnet sie sich aus durch ein eigenes klinische Bild beim Hunde (*Klarénbeek*), und, wenn man nach den ersten 11 Fällen urteilen darf, auch beim Menschen: Sie verlief leicht und ohne Icterus.

Als dritte in Europa vorkommende *Leptospirosis* wäre das Schlammfieber zu nennen, das man in Schlesien und in Russland kennt, in unserm Lande dagegen noch nicht gesehen hat. Ihr Erreger, die *L. grippothyphosa* steht der klassischen *Leptospire* noch viel ferner wie die *Canicola*. Mitagglutination kommt kaum vor. Auch dieser Krankheit giebt, neben der besonderen antigenen Structur, Klinik und Art des Vorkommens ein Anrecht auf einen eigenen Platz im System.

Wir treten hiermit in Gegensatz zu *Schlossberger*, der sich neuerdings auf einen Standpunkt stellt, der sich dem von *Bärman* und *Zuelzer* — von unserem Institut oft Bestrittenen — nähert. *Schlossberger* e.s. meinen, „dass sich die *Weilspirochaeten* nicht in scharf unterscheidbare Typen trennen lassen“, wobei sie selbst indische und japanische Stämme hereinbeziehen. Unserer Auffassung nach hatte gerade dies vermieden werden müssen, wollte man nicht das an sich complicierte Problem unauflösbar machen.

9. Zur Bereitung hochwertiger Immunsera wurden auch tote Kul-

turen verwendet. Die abtötende Wirkung der Wärme konnte durch das Mikroskop, durch Überimpfen auf frischen Nährboden und durch das Tierexperiment kontrolliert werden. Erwärmung auf 50° C. während einer halben Stunde tötete alles ab. Nach nur 20 Minuten waren noch einzelne Leptospiren beweglich, Kultur und Tierexperiment blieben negativ. Nach 10 Minuten Erwärmung hat die Beweglichkeit kaum gelitten, die Kultur wächst weiter, aber das Meerschweinchen wird nicht krank. Mikroskopisch ist also das Leben der Leptospiren, selbst wenn sie schon schwer gelitten haben, am längsten zu verfolgen. Der Tierversuch dagegen ist viel empfindlicher und verrät schon leichte Beschädigungen. Vermutlich vernichtet bereits die kurze Erwärmung von 10 Minuten die Elemente, welche als Träger der Virulenz fungieren. Bemerkenswert ist, dass die Kultur nach Überimpfen ihre volle Pathogenität zurückgewinnt, es handelt sich also um eine zeitweilige Veränderung (Adaptation nach van Loghem).

Die durch Erwärmen getöteten Leptospiren riefen beim Kaninchen die Entwicklung von Immunstoffen hervor in einer Stärke, die der mit lebender Kultur erhaltenen wenig nachgab. Siedetemperatur lieferte dasselbe Resultat, man darf das Antigen daher als thermostabil ansehen.

Beim Menschen gaben wir eine Vaccin, das an zwei aufeinanderfolgenden Tagen je eine halbe Stunde auf 70° C. erhitzt war. Nach zweimaliger Injection wurden Titer erreicht, die zwischen 100 und 1000 lagen. In die Vene eingespritzt scheint das Vaccin schneller und kräftiger zu wirken; ausserdem macht dies keine Lokalbeschwerden. Nach dreimaliger Verabreichung sahen wir leichte Anaphylaxie, man bleibt darum besser bei zwei Dosen.

Die Dauer des Schutzes, der sich auf diese Weise erreichen lässt, entzieht sich vorläufig unserm Urteil. Die Japaner machten günstige Erfahrungen. Eventuell käme zur Verlängerung des Schutzes die Anwendung avirulent gewordener Kulturen in Betracht.

Die Vaccination gegen die Weilsche Krankheit dürfte in unserm Lande einstweilen nur für das Personal von Laboratorien, die mit Leptospiren oder Ratten arbeiten, und darum, wie die Thatsachen lehren, mehr gefährdet sind, angewiesen sein.

LITERATUURLIJST.

- Adamski*, Klin. W. 1926, p. 1615, Weilsche Krankheit.
- Alston e.a.*, Lancet 1935 I, p. 806, Leptospiral jaundice among sewerworkers.
- *en Brown*, Brit. Med. Jl. 1935 II, p. 339. The prevalence of Weil's disease in certain occupations.
- Baermann*, Gen. T. v. N. I. 1927, p. 73. Klinische und experimentelle Untersuchungen über Spirochätenerkrankungen und Spirochäten in Deli (Sumatra).
- *en Smits*, Zbl. Bakt. I, Orig. 1928, Bd. 105, p. 368. Diagnose, Klinik, Epidemiologie und Therapie der kurzfristigen Weilschen Krankheit.
- *en Zuelzer*, Klin. W. 1927, p. 979. Ueber die Aetiologie der Weilschen Krankheit.
- , —. Zbl. Bakt. I, Orig. 1928, Bd. 105, p. 345. Die Einheitlichkeit aller tier- und menschenpathogenen Spirochaeten vom Typus der Spir. icterogenes, syn. icterohaemorrhagiae, und die mit ihr verwandten Wasserspirochaeten vom gleichen Typus.
- Beger*, Arb. Reichsges. Amt 1922, Bd. 53, p.1. Ueber active Immunisierung mit „gekupfertem“ Spirochaetenkulturen bei der Weilschen Krankheit.
- Blanchard en Lefrou*, Pr. Med. 1922, p. 1017. La recherche des parasites sanguicoles extraglobulaires par la méthode de la triple-centrifugation du sang.
- Davidson, Campbell e.a.*, Brit. Med. Jl. 1934 II, p. 1137. A study of 19 cases occurring chiefly among fish-workers.
- Dhont, Klarenbeek, Schüffner en Voet*, Ned. T. v. Gen. 1934, p. 5197. De leptospiroses bij den hond en de beteekenis der leptospira canicola.
- Dinger*, Gen. T. v. N. I. 1933, p. 402. Een geval van de ziekte van Weil te Batavia met enkele opmerkingen naar aanleiding van den daarbij geïsoleerden leptospirenstam.
- Erber*, Off. Intern. d'Hyg. 1934, p. 1757. La spirochétose icterohémorragique en France de 1923 à 1933.
- Farley*, Brit. Med. Jl. 1934 II, p. 10. Weil's disease among sewer-workers in London.
- Gachgens*, Med. Welt 1934, p. 825. Weitere Beobachtungen über die serologische Diagnose der Weilschen Krankheit.
- Goudsmit, Hammer en Wolff*, Ned. T. v. Gen. 1925 I, p. 430. Onderzoekingen bij een geval der ziekte van Weil.
- Huebener en Reiter*, Z. f. Hyg. 1916, Bd. 81, p. 171. Die Aetiologie der Weilschen Krankheit.

- Ido, Ito, Hoki en Wani*, J. Exp. Med. 1916, Vol. 24, p. 471. The prophylaxis of Weil's disease (spirochaetosis icterohaemorrhagiae).
- Inada, Ido, Hoki, Kaneko en Ito*, J. Exp. Med. 1916, Vol. 23, p. 377. The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease.
- Kirschner*, Z. Hyg. 1931, Bd. 113, p. 48. Umwandlungsversuche an Wasserspirochaeten in Java.
- *Gen. T. v. N. I.* 1932, p. 658. Waterspirochaeten en de ziekte van Weil.
- Kisker*, Z. Imm. f. 1935, Bd. 85, p. 383. Ueber den Verlauf des Agglutinations-titer bei Weilscher Krankheit.
- Klarenbeek*, Tierärztl. Rschr. 1930, p. 65 en 94. Die akute Leptospirosen beim Hunde in Zusammenhang mit dem spontan bei Mensch und Tier vorkommende und in der Natur frei lebende Wasserleptospiren.
- *Tijdschr. Diergen.* 1935, p. 310. De leptospiroses bij den hond en de betekenis der leptospira canicola.
- *en Schüffner*, Ned. T. v. Gen. 1933, III, p. 4271. Het voorkomen van een afwijkend leptospiren-ras in Nederland.
- Kourenaar*, *Gen. T. v. N. I.* 1923, p. 225. Over een epidemie van koortsen met en zonder icterus veroorzaakt door een leptospira.
- Martin en Pettit*, C. r. Soc. de Biol. T. 80, 1917, p. 10. Présence de Sp.-icterohaemorrhagiae chez le surmulot de la zone des armées.
- Mochtar*, Proefschrift Amsterdam, 1927. Onderzoekingen omtrent leptospira-stammen.
- *Gen. T. v. N. I.* 1933, p. 1182. Over het voorkomen van de ziekte van Weil te Semarang en omstreken.
- Nieschulz en Wawo-Roento*, Ned. T. v. Gen. 1930, p. 225. Experimenteele infecties van paarden met leptospira icterohaemorrhagiae.
- Noguchi*, Jl. Exp. Med. Vol. 27, 1918, p. 575. Morphological characteristics and nomenclature of leptospira (spirochaeta) icterohaemorrhagiae (Inada en Ido).
- *Lancet* 1922, p. 1185, Researches on Yellow-Fever.
- Otten*, Feestbundel *Gen. T. v. N. I.* 1936, p. 84. De pestbestrijding op Java (1911—1935).
- Páez*, Rev. Inst. bact. Chile, 1935, p. 12. Untersuchungen über die Ikterus-spirochäte. Stämme aus Ratten und freilebende Stämme.
- Postmus*, Ned. T. v. Gen. 1933, p. 2648. Het beloop van de sero-reactie bij oud-lijders aan de ziekte van Weil.
- *en Schultsz*, Ned. T. v. Gen. 1932, p. 252. Technische opmerkingen betreffende de bacteriologische en serologische diagnose der ziekte van Weil.
- Pot*, *Lancet* 1936, p. 1290. A macroscopic agglutination-test in Weil's disease.
- Proehoeman*, Proefschrift Amsterdam, 1930. Studies over de epidemiologie van de ziekte van Weil, over haren verwekker en de daaraan verwante organismen.
- Ruys*, Ned. T. v. Gen. 1933, p. 364. Het aantoonen van Leptospira icterohaemorrhagiae met behulp van tweevoudige centrifugatie.

- Ruys en Schüffner*, Ned. T. v. Gen. 1934, p. 3110. De waarde van absorptieproeven voor de serologische diagnose van verschillende leptospira-infecties.
- Sardeman*, Tijdschr. Diergen. 1930, p. 996. Orale infecties met *Leptospira icterohaemorrhagiae* bij paarden.
- Sardjito en Postmus*, Gen. T. v. N. I. 1927, p. 73. Onderzoek naar het voorkomen van leptospirae onder de rattenbevolking van Weltevreden.
- Schlossberger, Grillo en Scheele*, Klin. W. 1935, p. 1133. Ueber das Vorkommen von Typen bei der Spirochäte der Weilschen Krankheit.
- Schüffner*, Gen. T. v. N. I. 1918, p. 352. Ueber Infektiösen Ikterus und über einen Spirochätenbefund bei einer klinisch als Schwarzwasserfieber verlaufenen Erkrankung.
- , Arch. f. Schiffs H. 1925, Bd. 29, p. 333. Beitrag zur Leptospirose der Ratten.
- , Arch. f. Schiffs u. Tr. Hyg. 1932, Bd. 36, p. 239. Versuch der Vereinfachung der Serodiagnostik bei Weilscher Krankheit.
- , Ned. T. v. Gen. 1932, p. 4303. De serumbehandeling bij de ziekte van Weil.
- , Transact. Roy. Soc. Trop. Med. 1934, Vol. 28, p. 7. Recent work on leptospirosis.
- , *Kotter en Schultz*, Gen. T. v. N. I. 1935, p. 534. Ervaringen over besmettingen met hondenleptospiren (*L. canicola*).
- *en Kuenen*, Ned. T. v. Gen. 1923, p. 2018. Het voorkomen van spirochaeten van het type der *Sp. icterohaemorrhagiae* bij ratten in Amsterdam.
- *en Snijders*, Transact. 4th Congr. Far. East. Ass. Trop. Med. 1922. A case of Spirochaetosis icterohaemoglobinurica.
- *en Walch-Sorgdrager*, Ned. T. v. Gen. 1936, p. 3000. Meningitis bij ziekte van Weil.
- Sieburgh*, Proefschrift Amsterdam, 1926. De Triple-Centrifugatie-methode in de Diagnostiek van Trypanosen en Spirochaetosen.
- Slot en v. d. Walle*, Gen. T. v. N. I. 1932, p. 1582. Leptospirosen in Bangkinang en omgeving.
- Snijders*, Gen. T. v. N. I. 1923, p. 489. Spirochaetosis ictero-haemoglobinurica en spirochaetosis ictero-haemorrhagica.
- Soesilo*, proefschrift Amsterdam, 1925. Vergelijkende studie van enkele pathogene leptospirenstammen en leptospiren afkomstig van de rattenbevolking van Amsterdam en omgeving.
- Van Thiel*, Zbl. Bakt. I. Orig. Bd. 127, 1933, p. 290. Die Umwandlung von *Leptospira pseudoicterogenes*, Stamm Leiden.
- Uhlenhuth*, Münch. M. W. 1930, p. 2047 en 2098. Zur Epidemiologie der Weilschen Krankheit mit besonderer Berücksichtigung der Wasserinfection.
- *en Fromme*, Z. f. Imm. f. 1916, Bd. 25, Orig. p. 317. Untersuchungen über die Aetiologie, Immunität und spezifische Behandlung der Weilschen Krankheit (*Icterus infectiosus*).

- Uhlenhuth en Fromme*, Handb. der pathog. Mikroorg. Kolle u. Wassermann 1930 Lief. 41, Bd. 7. Die Weilsche Krankheit.
- *en Zimmermann*, D. Med. W. 1933, p. 1393. Die weisse Ratte als Ueberträgerin der Weilschen Krankheit.
- , —. Med. Kl. 1934, p. 464. Ueber ein Laboratoriumsinfektion mit Weilscher Krankheit, sowie über die Serumtherapie dieser Erkrankung.
- , —. D. Med. W. 1936, p. 891. Hunde als Träger der Spirochaeten von Weil-Typus.
- *en Zuelzer*, Klin. W. Schr. 1922, p. 2124. Ueber die biologischen und immunisatorischen Beziehungen des Erregers der Weilschen Krankheit.
- Verzoort*, Gen. T. v. N. I. 1922, p. 679. Spirochaeten bij acute koortsige ziekten van onbekende oorsprong in de tropen.
- Van der Velde*, Gen. T. v. N. I. 1923, p. 153. Bloedspirochaeten bij koorts en Spirochaetosis ictero-haemorrhagica.
- Walch*, Gen. T. v. N. I. 1926, p. 115. Demonstratie van en leptospiren geïsoleerd bij een patiënt, die klinisch het beeld van Weilsche ziekte vertoont.
- *en Soesilo*, Gen. T. v. N. I. 1927, p. 84. Vergelijkend serologisch onderzoek van te Batavia geïsoleerde en eenige andere leptospiren.
- Wani*, Z. f. Imm. f. 1933, Bd. 79, p. 1. Ueber die Prophylaxe der Spirochaetosis icterohaemorrhagica (Weilsche Krankheit) durch Schutzimpfung.
- Wolff*, Proefschrift Amsterdam, 1924. Onderzoekingen betreffende cultuur en serologie der leptospirae.
- . Feestbundel Gen. T. v. N. I. 1936, p. 499. Serologische onderzoekingen bij ongevallen van leptospiroses febrilis.
- Zimmermann en Arjona*, Z. f. Imm. f. 1934, Bd. 84, p. 111. Serologischer Titer und Heilwert der Seren gegen Weilsche Krankheit.
- Zuelzer*, Zbl. Bakt. I. Orig. Bd. 105, 1928, p. 345. Zur Hydrobiologie der Spirochäta icterogenes syn. biflexa in den Tropen.
- . Arch. f. Hyg. 1930, p. 282. Beiträge zur Weilfrage.
- . Zbl. Bakt. I. Orig. Bd. 137, 1936, p. 189. Zur Biologie und Epidemiologie der Weilschen Krankheit, mit besonderer Berücksichtigung von Dänemark. II.
-

